

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

Praha, 2023

**Mgr. Michael Hudec**

**Univerzita Karlova**  
**3. lékařská fakulta**

## Disertační práce

Mechanismy prezentace antigenu v etiopatogenezi celiakie

Mechanisms of antigen presentation in the etiopathogenesis of celiac disease

Školitel: prof. MUDr. Marie Černá, DrSc.

Konzultant: doc. Valerie O'Leary, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31. 3. 2023

Michael Hudec

Podpis: .....

## Identifikační záznam

HUDEC, Michael. *Mechanismy prezentace antigenu v etiopatogenezi celiakie. [Mechanisms of antigen presentation in the etiopathogenesis of celiac disease]*. Praha, 2023. 118 stran, 2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav lékařské genetiky. Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Marie Černá, DrSc.

**Klíčová slova:** *autoimunita, celiakie, dendritické buňky, monocyty, T lymfocyty, lidské leukocytární antigeny, exozomy*

**Key words:** *autoimmunity, celiac disease, dendritic cells, monocytes, T cells, human leukocyte antigens, exosomes*

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkoval své školitelce prof. MUDr. Marii Černé, DrSc. za neustálou, velice cennou podporu a důvěru při návrhu zaměření této práce. Bez této pomoci by tato práce nemohla vzniknout a jsem za to velice vděčný.

Dále bych chtěl poděkovat doc. Valerii O`Leary, Ph.D. za užitečné rady a pomoc při realizaci této práce. Velice si vážím času, který mi byl věnován.

Dále bych chtěl poděkovat za pomoc všem kolegům a spolužákům z Ústavu lékařské genetiky 3. LF UK. Bez každodenní dobré nálady a spolupráce v kolektivu není možná konstruktivní práce.

Nakonec bych chtěl poděkovat své manželce a rodině za podporu a pochopení, bez kterého by to nešlo.

## OBSAH

|      |                                                                                                      |    |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.   | ABSTRAKT                                                                                             | 11 |
| 2.   | ABSTRACT                                                                                             | 13 |
| 3.   | LITERÁRNÍ ÚVOD A PŘEHLED DANÉ PROBLEMATIKY                                                           | 15 |
| 3.1. | Celiakie obecně                                                                                      | 15 |
| 3.2. | Molekuly HLA a jejich funkce při antigenně specifické reakci                                         | 18 |
| 3.3. | Vznik autoimunitní reakce u celiakie                                                                 | 21 |
| 3.4. | Monocyty a jejich role v rozvoji celiakie                                                            | 22 |
| 3.5. | Subpopulace dendritických buněk a interakce s lymfocyty                                              | 25 |
| 3.6. | T regulační lymfocyty                                                                                | 26 |
| 3.7. | Extracelulární transport a buněčná signalizace                                                       | 27 |
| 4.   | VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE                                                                                  | 29 |
| 5.   | STANOVENÍ HYPOTÉZ                                                                                    | 30 |
| 6.   | POPIS POUŽITÝCH EXPERIMENTÁLNÍCH METOD, VČETNĚ STATISTICKÝCH                                         | 31 |
| 6.1. | Klinická data, CeD diagnóza a popis členů studovaných rodin                                          | 31 |
| 6.2. | Izolace monocytů z periferní krve                                                                    | 31 |
| 6.3. | Kultivace a diferenciaci dendritických buněk z monocytů, sběr růstového media                        | 32 |
| 6.4. | Izolace T lymfocytů z periferní krve a kultivace v růstovém mediu                                    | 33 |
| 6.5. | Kokultivace moDC a T lymfocytů                                                                       | 34 |
| 6.6. | Detekce molekul HLA-DQ na T lymfocytech kultivovaných v růstovém mediu pomocí konfokální mikroskopie | 34 |

|       |                                                                                                                                                                                  |           |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.7.  | <b>Detekce IL-2 jako aktivačního signálu T lymfocytů pomocí metody ELISA</b>                                                                                                     | <b>35</b> |
| 6.8.  | <b>Analýza buněk průtokovou cytometrií</b>                                                                                                                                       | <b>35</b> |
| 6.9.  | <b>Analýza membránových antigenů pomocí konfokální mikroskopie</b>                                                                                                               | <b>36</b> |
| 6.10. | <b>Identifikace a analýza extracelulárních lokalizačních motivů (ELM) přítomných v genech HLA-DQA1 a HLA-DQB1</b>                                                                | <b>37</b> |
| 6.11. | <b>Statistická analýza</b>                                                                                                                                                       | <b>37</b> |
| 7.    | <b>PŘEHLED DOSAŽENÝCH VLASTNÍCH VÝSLEDKŮ</b>                                                                                                                                     | <b>38</b> |
| 7.1.  | <b>Vysoká prevalence CeD v České republice představuje vyšší riziko rozvoje autoimunitního onemocnění u rodinných příslušníků napříč generacemi</b>                              | <b>38</b> |
| 7.2.  | <b>Odlišná exprese transmembránových znaků naznačuje, že monocyty CeD pacientů mají schopnost se diferencovat do DC po expozici LPS/PTG</b>                                      | <b>39</b> |
| 7.3.  | <b>Identifikace nového expresního profilu CD33:CD64 u monocytů CeD pacientů</b>                                                                                                  | <b>41</b> |
| 7.4.  | <b>Dendritické buňky CeD pacientů vykazují vyšší míru aktivace po kontaktu s gliadinem</b>                                                                                       | <b>42</b> |
| 7.5.  | <b>Zvýšená distribuce CD86 na povrchu moDC u CeD pacientů oproti CTL</b>                                                                                                         | <b>45</b> |
| 7.6.  | <b>Zvýšená distribuce HLA-DQ na povrchu moDC u CeD pacientů oproti CTL</b>                                                                                                       | <b>47</b> |
| 7.7.  | <b>Kultivační medium obsahující exozomy produkované zralými dendritickými buňkami je schopno aktivovat T lymfocyty bez nutnosti mezibuněčné interakce</b>                        | <b>48</b> |
| 7.8.  | <b>Alely genů HLA-DQA1 a HLA-DQB1 asociované se zvýšeným rizikem rozvoje CeD obsahují vyšší frekvenci sekvencí lokalizujících pro extracelulární transport</b>                   | <b>50</b> |
| 7.9.  | <b>T lymfocyty vykazují zvýšenou pozitivitu HLA-DQ na cytoplazmatické membráně po kultivaci v kultivačním mediu obsahující exozomy produkované zralými dendritickými buňkami</b> | <b>52</b> |
| 7.10. | <b>Snížená schopnost indukce T regulačních lymfocytů po expozici kultivačního media obsahujícího exozomy produkované zralými dendritickými buňkami</b>                           | <b>53</b> |
| 8.    | <b>DISKUZE METODICKÝCH POSTUPŮ A VÝSLEDKŮ, VČETNĚ SROVNÁNÍ S LITERATUROU</b>                                                                                                     | <b>56</b> |
| 9.    | <b>ZÁVĚRY A ZHODNOCENÍ CÍLŮ A HYPOTÉZ PRÁCE</b>                                                                                                                                  | <b>67</b> |

|     |                                      |    |
|-----|--------------------------------------|----|
| 10. | SOUHRN                               | 69 |
| 11. | SUMMARY                              | 70 |
| 12. | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY            | 71 |
| 13. | PUBLIKAČNÍ ČINNOST AUTORA            | 88 |
| 14. | PUBLIKACE SPOJENÉ S DISERTAČNÍ PRACÍ | 89 |

## SEZNAM ZKRATEK

|         |                                                                                                                          |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| APC     | buňka prezentující antigen<br>z anglického „antigen presenting cell“                                                     |
| ATH     | autoimunitní zánět štítné žlázy                                                                                          |
| AU      | arbitrární jednotky<br>z anglického „arbitrary units“                                                                    |
| CD      | diferenční molekula<br>z anglického „cluster of differentiation“                                                         |
| cDC     | konvenční dendritická buňka                                                                                              |
| CeD     | celiakie<br>z anglického „celiac disease“                                                                                |
| CIITA   | MHC II transaktivátor                                                                                                    |
| CLIP    | peptid s invariantním řetězcem asociovaný s HLA II. třídou<br>z anglického „class II-associated invariant chain peptide“ |
| CTL     | zdravý dárc                                                                                                              |
| CTLA-4  | antigen 4 cytotoxického T lymfocytu<br>z anglického „cytotoxic T lymphocyte“                                             |
| DAMP    | molekuly asociované s poškozením<br>z anglického „damage-associated molecular patterns“                                  |
| DC      | dendritická buňka                                                                                                        |
| ELM     | motiv lokalizující pro exozomální transport<br>z anglického „exosome localization motifs“                                |
| EMA     | endomysium specifický antigen                                                                                            |
| ER      | endoplasmatické retikulum                                                                                                |
| EV      | extracelulární váček                                                                                                     |
| FBS     | fetální bovinní sérum                                                                                                    |
| FBSeF   | fetální bovinní sérum bez exozomů<br>z anglického „fetal bovine serum exosome free“                                      |
| FcγRI   | Fcγ receptor-I pro IgG CD64                                                                                              |
| FcγRIII | Fcγ receptor-III pro IgG, CD16                                                                                           |
| Foxp3   | transkripční faktor forkhead box P3                                                                                      |
| FSC     | přímý rozptyl<br>z anglického „forward scatter“                                                                          |

|               |                                                                                                                                |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GFD           | léčba bezlepkovou dietou<br>z anglického „gluten free diet“                                                                    |
| GM-CSF        | faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů                                                                             |
| GMP           | granulocyty-monocytární prekursor                                                                                              |
| HLA           | lidský leukocytární antigen<br>z anglického „human leukocyte antigen“                                                          |
| HSC           | hematopoetická kmenová buňka                                                                                                   |
| IFN- $\gamma$ | interferon- $\gamma$                                                                                                           |
| IgA           | imunoglobulin A                                                                                                                |
| IgG           | imunoglobulin G                                                                                                                |
| Ii            | invariantní řetězec                                                                                                            |
| IL-21         | interleukin 21                                                                                                                 |
| ILE           | Intraepiteliální lymfocyt                                                                                                      |
| ITAM          | doména obsahující imunoreceptorový aktivační tyrozinový motiv<br>z anglického „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ |
| ITIM          | doména obsahující imunoreceptorový inhibiční tyrozinový motiv<br>z anglického „immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“ |
| iTreg         | indukované Treg                                                                                                                |
| LFA-1         | leukocytární funkční antigen 1                                                                                                 |
| lncRNA        | dlouhé nekódující RNA<br>z anglického „long non-coding RNA“                                                                    |
| LPS           | lipopolysacharid                                                                                                               |
| mDC           | myeloidní dendritická buňka                                                                                                    |
| MDP           | monocyty-dendritický prekursor                                                                                                 |
| MFI           | median intenzity fluorescence                                                                                                  |
| MHC           | hlavní histokompatibilní komplex<br>z anglického „major histocompatibility complex“                                            |
| MIIC          | MHC II kompartmentů<br>z anglického „MHC II compartement“                                                                      |
| MIC-A         | molekuly příbuzné s MHC I. Třídou<br>z anglického „MHC class-I related molecules“                                              |
| moDC          | dendritická buňka derivovaná z monocyту                                                                                        |
| MVB           | multivesikulární tělísko<br>z anglického „multivesicular body“                                                                 |

|              |                                                                                              |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| NK buňka     | buňka přirozený zabíječ<br>z anglického „natural killer cell“                                |
| NOD          | neobézní diabetický kmen myši                                                                |
| nTreg        | přirozený Treg<br>z anglického natural Treg                                                  |
| PAMP         | molekuly asociované s patogeny<br>z anglického „pathogen-associated molecular patterns“      |
| PBMC         | jednojaderné buňky periferní krve<br>z anglického „peripheral blood mononuclear cell“        |
| pDC          | plazmacytoidní dendritická buňka                                                             |
| PPR          | antigenní vzory spojené s patogeny<br>z anglického „pattern recognition receptor“            |
| PTG          | gliadinové peptidy<br>z anglického „pepsin-trypsin digested gliadin peptides“                |
| SH           | Src homologická doména                                                                       |
| SHP          | Src homologické doména obsahující fosfatázu                                                  |
| SLE          | systémový lupus erythematosus                                                                |
| SSC          | boční rozptyl<br>z anglického „side scatter“                                                 |
| TCR          | T lymfocytární receptor<br>z anglického „T cell receptor“                                    |
| TG2          | tkáňová transglutamináza 2                                                                   |
| TGA          | TG specifický antigen                                                                        |
| TGF- $\beta$ | transformující růstový faktor $\beta$<br>z anglického „transforming growth factor $\beta$ “  |
| Th           | pomocný T lymfocyt<br>z anglického „T helper cell, CD4+“                                     |
| TPO          | tyreoidální peroxidáza                                                                       |
| Treg         | T regulační lymfocyt                                                                         |
| ULN          | horní hranice normy                                                                          |
| WGO          | Světová gastroenterologická organizace<br>z anglického „World Gastroenterology Organization“ |

## 1. ABSTRAKT

Celiakie (CeD) je chronické autoimunitní onemocnění, které se rozvíjí jako odpověď imunitního systému na přítomnost lepku (glutenu) v tenkém střevě. CeD se projevuje nejen klasickými střevními příznaky: bolest břicha, obstrukce nebo diarrhea, ale i celkovými méně běžnými příznaky: anémie, osteoporóza, psychiatrické poruchy či poruchy menstruačního cyklu. HLA rizikové alely predisponující ke vzniku celiakie jsou HLA-DQ2 (DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01) a HLA-DQ8 (DQA1\*03:01 / DQB1\*03:02). Další polymorfismy asociované s celiakií ležící mimo HLA lokus (6p21.3) se nacházejí v oblastech 5q32 a 19p13, avšak s neobjasněnou souvislostí s rozvojem CeD. Glykoproteiny HLA II. třídy jsou exprimovány na buňkách prezentujících antigen (APC), mezi které patří dendritické buňky, makrofágy a B lymfocyty. Jedním z několika možných prekurzorů dendritických buněk jsou monocyty, které cirkulují v krevním řečišti. Odchytky ve frekvenci intermediárních monocytů jsou přímo asociovány s autoimunitními onemocněními, jako jsou Crohnova choroba či revmatoidní artritida. Je známo, že monocyty pacientů s CeD reagují na přítomnost glutenu prozánětlivě. Z toho lze vyvodit, že v případě CeD vzniká odpověď na gluten dříve, než aktivací T lymfocytů specifických na gluten. Konvenční způsob přímé interakce imunitních buněk je dnes rozšířen o možnost přenosu informace pomocí extracelulárních váčků, exozomů. Tyto váčky vznikají rozpadem multivezikulárního tělíska a jsou schopné přenášet proteiny, DNA a několik typů regulačních RNA, včetně lncRNA. Na povrchu exozomů se mohou vyskytovat i HLA molekuly spolu s kostimulačními receptory CD86. V případě celiakie doposud nebyl studován vliv exozomů produkovaných dendritickými buňkami na expresi HLA a stimulaci T lymfocytů. Frekvence monocytárních subpopulací, které u jiných autoimunitních chorob vykazují změny, nebyly v kontextu CeD analyzovány.

V této disertační práci byla nejdříve analyzována exprese HLA II. třídy a dalších povrchových znaků monocytárních subpopulací, dendritických buněk diferencovaných z monocytů a T lymfocytů za použití imunologicko-molekulárních a biochemických metod. Nebyla nalezena odchylka ve frekvenci intermediární nebo neklasické subpopulace monocytů v kontextu CeD. Byl však objeven CeD specifický expresní fenotyp CD14<sup>+</sup> monocytů vyjádřený odlišnou expresí CD33 a CD64. Tento fenotyp lze vysvětlit jako prozánětlivé nastavení této populace se sníženou schopností regulace inhibice fagocytózy. Dále byla potvrzena efektivnější diferenciaci monocytů do dendritických buněk a vyšší exprese HLA-DQ na povrchu dendritických buněk po kontaktu s glutenem. Vyšší

aktivita dendritických buněk CeD pacientů asociovala s produkcí exozomů těmito buňkami. T lymphocyty stimulované exozomy CeD pacientů byly více aktivované a docházelo k nižší indukci transformace do iTreg populace. Tato pozorování zapadají do konceptu dysregulované imunitní tolerance. Vůbec poprvé byla v této studii analyzována, v kontextu celiakie, signální sekvence cílící pro extracelulární transport do exozomů v genech HLA-DQA1 a HLA-DQB1.

Tato práce přináší nový pohled na asociaci rizikových HLA-DQ alel s rozvojem celiakie. Molekuly těchto HLA alel II. třídy vykazují vyšší afinitu vůči deaminovaným glutenovým peptidům. Práce navíc popsala, že predispoziční HLA-DQ alely obsahují vyšší frekvenci signálních sekvencí cílící pro extracelulární transport do exozomů. Tímto nově obohatila a rozvinula pohled na interakci dendritické buňky a T lymfocytu v kontextu rozvoje CeD. Dále práce ukázala, že v případě CeD mohou být gluten-reaktivní dendritické buňky odvozeny ze snadněji diferencovatelných CD14<sup>+</sup> monocytů se specifickým fenotypem exprese povrchových molekul CD33 a CD64. Tyto poznatky je možné využít pro diagnostické účely. Pozorování ohledně vztahu HLA a exozomů nabízejí možnosti pro modifikace extracelulární signalizace mezi dendritickými buňkami a T lymfocyty a v konečném důsledku i pro terapeutické využití.

## 2. ABSTRACT

Celiac disease (CeD) is a chronic autoimmune disease that develops as a response of the immune system to the presence of gluten in the small intestine. CeD is manifested not only by classic intestinal symptoms: abdominal pain, constipation or diarrhea, as well as complex less common symptoms: anemia, osteoporosis, psychiatric disorders or menstrual cycle disorders. HLA risk alleles predisposing to origin of celiac disease are HLA-DQ2 (DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01) and HLA-DQ8 (DQA1\*03:01 / DQB1\*03:02). There are other celiac disease-associated polymorphisms outside of HLA locus (6p21.3) that are located in 5q32 and 19p13 regions with unclear connection to CeD development. HLA class II glycoproteins are expressed on antigen presenting cells (APC) that include dendritic cells, macrophages and B cells. Monocytes are one of several possible dendritic cell precursors that circulate in the bloodstream. Deviations in the frequency of intermediate monocytes are directly associated with autoimmune disorders such as Crohn's disease or rheumatoid arthritis. It is known that the monocytes of CeD patients show pro-inflammatory reaction in the presence of gluten. It means that, in the context of CeD, the response to gluten arises earlier than the activation of gluten-specific T cells. The conventional way of direct interaction of immune cells is nowadays extended by the possibility of information transfer using extracellular vesicles, exosomes. These vesicles originate from the multivesicular body and they are capable of carrying proteins, DNA and several types of regulatory RNAs, including lncRNAs. HLA molecules together with costimulatory receptors CD86 can also occur on the surface of exosomes. In the case of celiac disease, the influence of exosomes producing by dendritic cells on HLA expression and stimulation of T lymphocytes has not been studied yet. The frequencies of monocyte subpopulations, which show changes in other autoimmune diseases, have not been analysed in the context of CeD.

In this dissertation thesis, at the earliest, the expression of HLA class II and other surface markers was analysed on monocyte subpopulations, monocyte derived dendritic cells and T lymphocytes, using immunological-molecular and biochemical methods. There was found no variation in the frequency of intermediate or non-classical monocyte subpopulations in the context of CeD. However, CeD-specific expression phenotype of CD14<sup>+</sup> monocytes, shown by different expression of CD33 and CD64, was discovered. This phenotype can be explained as pro-inflammatory setting of this population with re-

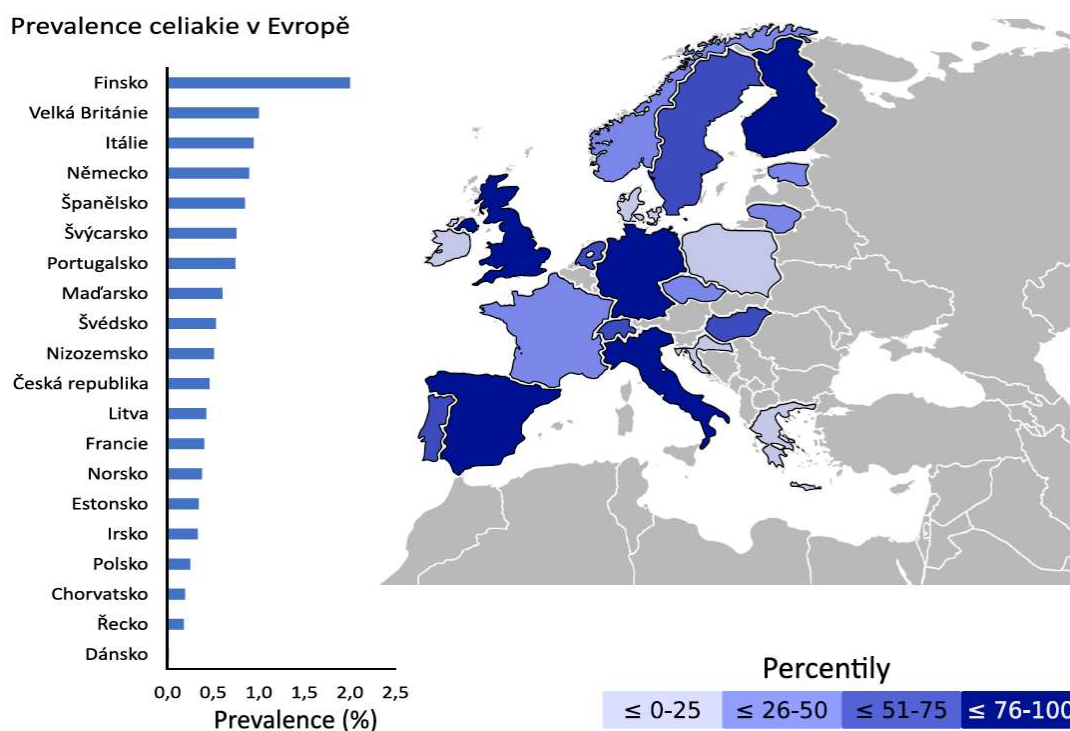
duced ability to regulate the inhibition of phagocytosis. Furthermore, the enhanced differentiation of monocytes to dendritic cells and the higher expression of HLA-DQ on the surface of dendritic cells were confirmed after contact with gluten. The higher activity of dendritic cells from CeD patients was associated with the production of exosomes by these cells. T lymphocytes stimulated with exosomes from CeD patients were more activated, and there was the lower induction of transformation to iTreg population. These observations are in the agreement with the concept of dysregulated immune tolerance. For the first time, in this study, the exosome localisation motifs in HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes were analysed in the context of celiac disease.

This thesis brings new insight into the association of risk HLA-DQ alleles with the development of celiac disease. The molecules of these HLA class II alleles prove higher affinity to deaminated gluten peptides. In addition, the thesis described that predisposition HLA-DQ alleles contain higher frequency of the exosome localisation motifs. In this way, the view about the interaction of dendritic cell and T lymphocyte has been enriched and understood comprehensively in the context of CeD development. Furthermore, the thesis showed that, in the case of CeD, the gluten-reactive dendritic cells can be derived from easily differentiated CD14<sup>+</sup> monocytes with the specific expression profile of CD33 and CD64 surface molecules. These findings can be used for diagnostic purposes. Observations concerning the relation of HLA and exosomes offer possibilities for the modifications of extracellular signalling between dendritic cells and T lymphocytes, and in the upshot for the therapeutic application.

### 3. LITERÁRNÍ ÚVOD A PŘEHLED DANÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1. Celiakie obecně

Celiakie (CeD, z anglického Celiac Disease) je chronické autoimunitní onemocnění, které má významnou familiární dědičnou predispozici (Szałowska & Bak-Romaniszyn, 2013) danou určitým genotypem. Aktuální prevalence CeD v Evropě je 1 %, ale v jednotlivých státech se může značně lišit: Finsko – 2 %, Německo – 0,3 %, Itálie – 0,7 %, Velká Británie – 1,5 % (Mustalahti et al., 2010), Česká Republika 0,5 % (Prokopová, 2008) (Obr. 1). Incidence CeD je vyšší u žen v poměru 17,0 / 7,8 na 100 000 (King et al., 2020). CeD se projevuje širokým spektrem klinických příznaků včetně únavy, hubnutí, anémie, nauzey, zácpy nebo průjmů (Mäki & Collin, 1997). Patologické změny zahrnují atrofii klků, hyperplazii krypt, infiltraci a aktivaci zánětlivých buněk



**Obrázek č. 1, Prevalence celiakie v Evropě.** Převzato a upraveno z WGO (<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines>; 12/06/2021) (Bai & Ciacci, 2017).

(M. N. Marsh, 1992). CeD se vyvíjí po požití lepku (glutenu), strukturálního pšeničného proteinu, který se také nachází v ječmeni, žitu a ovsu (Ludvig M. Sollid, 2002). Po požití je gluten neúplně štěpen na krátké peptidy žaludečními a pankreatickými enzymy (Shan

et al., 2002), které procházejí vazivovou vrstvou střevní sliznice (*lamina propria mucosae*) tenkého střeva trans- nebo para- celulárními cestami a aktivují autoimunitní reakci (Malamut et al., 2008; Matysiak-Budnik et al., 2008; Schumann, Siegmund, Schulzke, & Fromm, 2017; Visser, Rozing, Sapone, Lammers, & Fasano, 2009).

Gluten je složen z gliadinu a gluteninu. Gliadin je obecně bohatý na aminokyseliny prolin a glutamin (Qiao et al., 2004; Ludvig M. Sollid, 2002). Hlavní efektorové buňky iniciující zánětlivou reakci jsou na diferenciací molekulu 4 pozitivní T lymfocyty (CD4, z anglického cluster of differentiation 4), které jsou specifické na gluten. Tyto T lymfocyty rozpoznávají antigenní peptidy odvozené od glutenu v komplexu s lidskými leukocytárními antigeny (HLA, z anglického human leukocyte antigens; viz kapitola 3.2), a to zejména II. třídy, pomocí svého T lymfocytárního receptoru (TCR, z anglického T cell receptor). Stimulační účinek antigenů odvozených z glutenu zvyšuje tkáňová transglutamináza 2 (TG2). Tento enzym deaminuje glutaminové zbytky na kyselinu glutamovou (Arentz-Hansen et al., 2000). Kromě své enzymatické aktivity se TG2 podílí na propojení fibroblastů a motilitě monocytů prostřednictvím interakcí s fibronektiny a integriny (Akimov & Belkin, 2001). Atrofie klků CeD by tedy mohla být způsobena autoprotilát-kami TG2, které narušují migraci fibroblastů a epitelálních buněk z krypt k vrcholu klků (Halttunen & Maki, 1999).

Deaminovaný antigen vykazuje záporný náboj na určitých pozicích aminokyselinového řetězce a zvyšuje svou afinitu k molekule HLA-DQ2 (Ludvig M. Sollid, 2002). Pravděpodobným zdrojem antigenů odvozených od glutenu jsou  $\alpha$ -gliadiny. Ty jsou nekompletně štěpeny proteázami na aminokyselinový řetězec LQLQPFPPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF dlouhý 33 aminokyselin. K dnešnímu dni bylo nalezeno 36 aminokyselinových řetězců, nejdelší obsahuje 36 aminokyselin z gluteninu (Van De Wal et al., 1999), nejkratší 7 aminokyselin z  $\alpha$ -gliadinu (Anderson, Degano, Godkin, Jewell, & Hill, 2000), odvozených z nekompletního štěpení glutenu. Tyto řetězce mají stimulační efekt (Ciccocioppo, Di Sabatino, & Corazza, 2005). Vysoké zastoupení prolinu v gliadinových antigenech jim propůjčuje rezistenci k enzymatické degradaci a umožňuje tvořit polyproliní šroubovicovou konformaci (Shan et al., 2002; Qiao et al., 2004). Takové vlastnosti dávají těmto antigenům schopnost se dobře vázat na pozice P4, P6 a P7 vazebného žlábků molekuly HLA-DQ2 (Kim, Quarsten, Bergseng, Khosla, & Sollid, 2004). Navíc je možné, že se molekuly HLA-DQ2 exponují s nadbytečnými peptidy s invariant-

ními řetězci asociovanými s HLA II. třídou (CLIP, z anglického Class II-associated invariant chain peptide). Tento stav umožňuje výměnu antigenů ve vazebném žlábků molekuly HLA II. třídy i v extracelulárním prostředí (Ito et al., 2018).

Vznik autoimunitní reakce není doposud objasněn. Jednou možnou teorií je, že T lymfocyty reagující s glutenovými peptidy byly odstraněny nebo anergizovány jako součást procesu nastavení tolerance proti orálním antigenům. Tudíž T lymfocyty reagují na tzv. neo-epitopy, které vznikají posttranslační modifikací. Tento koncept má význam pro pochopení prolomení tolerance k vlastním antigenům (Ludvig M. Sollid & Jabri, 2005). Autoprotilátky izotypu imunoglobulin A (IgA) a IgG jsou u pacientů s CeD totiž také namířeny proti  $\text{Ca}^{2+}$  aktivované (extracelulární) formě TG2 (Dieterich et al., 1997) a byly nalezeny i autoprotilátky proti kalretikulinu (Sánchez et al., 2000). Další teorie poukazuje na situaci, kdy se TG2 váže na gliadin (Stepniak & Koning, 2006). Tento komplex TG2-gliadin je rozpoznáván B lymfocyty, které pokud dostanou stimulační signál od T lymfocytů, začnou produkovat specifické autoprotilátky proti TG2 (L. M. Sollid, Molberg, Mcadam, & Lundin, 1997).

Další teoretické vysvětlení popisuje situaci, při které dochází ke zkřížené reakci mezi autoantigeny a antigeny patogenů, čili teorii molekulárních mimiker, kdy existuje určitá podobnost mezi antigeny odvozenými od gliadinu a antigeny patogenů. Např.: EIB protein lidského *adenoviru 12* sdílí aminokyselinovou sekvenci s  $\alpha$ -gliadinem (Kagnoff, Austin, Hubert, Bernardin, & Kasarda, 1984). Podobná shoda byla objevena i s antigeny *Candida albicans* (Nieuwenhuizen, Pieters, Knippels, Jansen, & Koppelman, 2003).

Podle evropských doporučení je pro diagnostiku celiakie u dětí vyžadován IgA protilátkový test na TG specifický antigen (TGA-IgA) (Husby et al., 2020) bez nutnosti biopsie. Vysoké riziko představuje 10 násobek hodnoty nad limit standartních hodnot pro TGA-IgA společně s IgA pozitivitou na endomysium specifický antigen (EMA-IgA). V případě nižších hodnot je doplňkovým diagnostickým testem stanovení hladiny IgG specifického pro antigen deaminovaného gliadinu (DGP-IgG), pro endomysium specifický antigen (EMA-IgG) a pro TG specifický antigen (TGA-IgG). Obecná snaha je nezatěžovat pacienta biopsií sliznice tenkého střeva. U pacientů dětského věku lze tedy uzavřít diagnózu pouze na základě měření hladin specifických autoprotilátek. U pacientů dospělého věku je stále doporučeno určit diagnózu na základě positivity na autoprotilátky a následné biopsii tenkého střeva. Histologický nále z této biopsie se hodnotí pomocí Marsh-Oberhuberovi stupnice (Dickson, Streutker, & Chetty, 2006). Tento systém rozlišuje 0. až 4. úroveň:

0 – Histologicky normální nález. V nálezu přítomno výrazně méně jak 30 intraepiteliálních lymfocytů (IEL) / 100 epiteliálních buněk.

1 – Histologicky normální nález. Hladina IEL se blíží hranici 30 / 100 epiteliálních buněk. Tento stav není průkazný a může předcházet rozvoji CeD v 10 % případů.

2 – Histologický nález s intermediárním poškozením střevní sliznice. Klky nevykazují patologické změny, ale nález je pozitivní na hyperplazii krypt. Hladina IEL je vyšší než 30 / 100 epiteliálních buněk. Tento stav stále nelze diagnostikovat jako CeD. Tomuto stadiu nejvíce odpovídají pacienti s probíhající léčbou, dietou bez glutenu (GFD, z anglického gluten free diet) nebo pacienti s dermatitis herpetiformis.

3 – Histologický nález pozitivní na intraepiteliální lymfocytózu (hladina IEL je výrazně vyšší než 30 / 100 epiteliálních buněk), hyperplazii krypt a atrofii klků. Na základě atrofie střevních klků lze tuto fázi rozdělit na typ A – mírná atrofie, B – intermediární atrofie a C – totální atrofie (plochá mukóza bez náznaku střevních klků). Tento stav ukazuje na poškození sliznice tenkého střeva odpovídající diagnóze CeD.

4 – Histologický nález bez střevních klků, ale s normálními kryptami a bez intraepiteliální lymfocytózy. Tento stav nepotvrzuje CeD. Pravděpodobnými příčinami poškození sliznice tenkého střeva jsou: podvýživa, aberantní homeostáza IEL, adenokarcinom tenkého střeva a další.

### **3.2. Molekuly HLA a jejich funkce při antigenně specifické reakci**

Oblast kódující HLA geny, nebo obecněji geny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, z anglického major histocompatibility complex), se nachází na chromozomu 6, konkrétněji v místě 6p21.3 a zahrnuje dvě důležité třídy: HLA I. třídu a HLA II. třídu (S. G. E. Marsh et al., 2010; Shiina, Hosomichi, Inoko, & Kulski, 2009). Obě třídy kódují heterodimerní transmembránové molekuly.

Primární funkcí HLA I. i II. třídy je vazba různých typů antigenních peptidů, které prezentují TCR na T lymfocytech. Po infekci HLA II. třídy s navázaným peptidem odvozeným z infekčního agens imunitní systém nejdříve aktivují. Infikované buňky signalizují svůj stav prezentací infekčního peptidu ve vazbě s HLA I. třídy a jsou následně rozpoznány a eliminovány.

Vysoký polymorfismus HLA zajišťuje jedinci, či celé populaci dostatečnou obranu proti nejrozumnějším antigenům řady patogenů. Pokud daný antigen není možné rozpoznat a navázat do vazebného žlábků, je pro buňky imunitního systému, zejména adaptivní

složky neviditelný. Je však vysoce pravděpodobné, že se tento antigen naváže do vazebného žlábků do jiného izotypu HLA molekuly. Pokud jedinec nedisponuje alelami s potřebnou afinitou, existuje vysoká pravděpodobnost, že jiný jedinec nebo část dané populace nese alely s potřebnou afinitou. Vzhledem k tomu, že HLA geny jsou exprimovány kodominantně, heterozygoti s dvojnásobným polymorfismem mají vyšší šanci rozpoznat a eliminovat patogen než homozygoti. Variabilitu HLA oblasti zvyšují i málo časté rekombinace. V případě celiakie se na riziku rozvoje choroby podílí efekt genové dávky, kdy HLA-DQ2 homozygoti mají 5x vyšší riziko rozvoje CeD (Vader et al., 2003).

Geny HLA I. třídy kódují proteiny, které jsou exprimovány na povrchu všech jaderných buněk organismu. Molekuly HLA I. třídy se skládají z  $\alpha$  řetězce, který obsahuje 3 domény –  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , a  $\beta 2$  mikroglobulinu, který je kódován na chromozomu 15. Geny I. třídy jsou dále rozděleny na klasické a neklasické. Klasické geny HLA I. třídy (HLA-A, HLA-B a HLA-C) kódují vysoce polymorfní molekuly, které vážou peptidy do vazebného žlábků a umožňují jejich prezentaci cytotoxickým CD8 pozitivním T lymfocytům (CD8+ T lymfocyty), čímž spouští destrukci cílové buňky. Neklasické geny HLA I. třídy (HLA-E, HLA-F a HLA-G) vykazují omezený polymorfismus. Také se podílejí na vazbě a prezentaci peptidů, ale jejich funkce jsou spíše v rámci navození tolerance (Klein & O’Higin, 1994). HLA-E se slabě exprimuje ve většině buněk organismu. HLA-F a G vykazují specifickou tkáňovou distribuci. Jejich přítomnost v placentární tkáni naznačuje, že hrají roli v ochraně před rejekcí plodu imunitním systémem matky (Diehl et al., 1996; Hviid, 2006; Ishitani, Sageshima, & Hatake, 2006; O’Callaghan & Bell, 1998).

Geny HLA II. třídy kódují proteiny, které se nacházejí na buňkách prezentujících antigen (APC, z anglického antigen presenting cell), zahrnující makrofágy, B lymfocyty a dendritické buňky (DC, z anglického dendritic cell), (Laupéze et al., 1999). Tyto molekuly rovněž vážou peptidy do vazebného žlábků a umožňují jejich prezentaci pomocným CD4+ T lymfocytům aktivující ostatní složky imunitního systému. Molekuly HLA II. třídy se skládají z  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce, každý řetězec obsahuje 2 domény –  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ . Geny kódující tyto řetězce mají 6 exonů: 1. exon kóduje vedoucí L sekvenci, 2. a 3. exon kódují extracelulární  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , resp.  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  domény, 4. exon kóduje transmembránovou oblast, 5. a 6. exon kódují intracelulární sekvenci (Loisel et al., 2007). HLA II. třídy se dělí na tři základní podoblasti: DR, DQ, DP, přičemž každá z nich obsahuje geny pro  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce (DRA a DRB1, DQA1 a DQB1, DPA1 a DPB1. S vyšším rizikem rozvoje CeD koreluje přítomnost izoformy HLA-DQ2 (alely DQA1\*05:01 / DQB1\*02:01) a izoformy HLA-DQ8 (alely DQA1\*03:01 / DQB1\*03:02), (Zajacova et al., 2016; Lebwohl et al., 2018).

Geny HLA II. třídy mají v promotoru tři regulační sekvence, boxy S, X (X1+X2), Y. Tyto signální sekvence rozpoznávají transkripční faktory (TF), které se do těchto boxů váží. Celý komplex TF je rozpoznáván MHC II transaktivátorem (CIITA), který spouští transkripci všech genů HLA II. třídy. Gen *CIITA* má několik promotorových oblastí, které aktivují jeho transkripci podle buněčného typu. Např.: myeloidní buňky spouští expresi CIITA z promotorové oblasti I (pI), lymfoidní buňky z pIII a epitelální buňky thymu z pIV. Tyto promotory genu CIITA se liší tím, jaký TF je rozpoznává, resp. jak konkrétní buněčný typ odpovídá na signální molekuly ze svého prostředí. Například pIV je aktivován jako odpověď na stimulaci interferonem- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Buňky trofoblastu nemají aktivní expresi CIITA z pIV, nejsou schopny reagovat na IFN- $\gamma$  a nedochází tedy u nich k expresi HLA II. třídy. Tento mechanismus se nejspíše podílí na ochraně proti rejekci plodu imunitním systémem matky (Reith, LeibundGut-Landmann, & Waldburger, 2005).

Po transkripci jsou mRNA molekuly HLA genů transportovány k endoplasmatickému retikulu (ER), kde probíhá jejich translace. HLA I. třídy jsou po translaci do ER sestaveny do správné konformace a do vazebného žlábků, který tvoří  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  domény, se naváže antigenní peptid přítomen v ER. Takto sestavý komplex HLA I. třídy-peptid je transportován na cytoplasmatickou membránu. HLA II. třídy jsou po translaci do ER také sestaveny do správné konformace. Na rozdíl od I. třídy, je však u HLA II. třídy vazebný žlábek tvořen  $\alpha 1$  a  $\beta 1$  doménami a v ER se místo antigenního peptidu do žlábků váže invariantní řetězec (Ii). Komplex HLA II. třídy-Ii je poté transportován do MHC II kompartmentu (MIIC, z anglického MHC II compartement), který fúzuje s lyzozomy. MIIC obsahuje lytické enzymy, které štěpí proteiny na krátké aminokyselinové řetězce, včetně Ii. Ve vazebném žlábků HLA II. třídy zůstává pouze část Ii zvaná CLIP. K disociaci CLIPu ze žlábků dochází za pomoci molekul HLA-DO a HLA-DM. Zároveň je CLIP vyměněn za exogenní peptid. Pokud je antigenní peptid navázán s dostatečnou afinitou, je celý komplex HLA II. třídy-peptid exprimován na cytoplasmatické membráně (Roche & Furuta, 2015).

HLA I a II. třídy se dále liší velikostí a uspořádáním vazebného žlábků. U HLA I. třídy je uzavřen a umožňuje vazbou pouze peptidům dlouhým 8-13 aminokyselin. Naproti tomu vazebný žlábek u HLA II. třídy není uzavřen a umožňuje vazbu delších peptidů, obvykle do 20 aminokyselin. Tyto odlišnosti jsou důležité ve chvíli, kdy jsou antigenní peptidy rozpoznávány pomocí TCR. Antigenní peptid navázaný na HLA II. třídy je v ote-

vřenému žlábků volně natažen, na rozdíl od uzavřeného žlábků u HLA I. třídy, který vynucuje centrální prohnutí peptidu (Holland, Cole, & Godkin, 2013). Důležité oblasti vazebného žlábků HLA II. třídy tvoří kapsy, obvykle označované jako P1, P4, P6, P9, které umožňují vazbu antigenního peptidu s nejvyšší afinitou.

CeD se rozvíjí u geneticky predisponovaných jedinců, kteří nesou rizikové alely genů HLA II. třídy (Lundin & Wijmenga, 2015). Nezávislé celogenomové studie však prokázaly vazbu lokusů s CeD i mimo HLA oblast. Dvě nejslibnější oblasti identifikované těmito studiemi jsou 5q32 a 19p13 (Babron et al., 2003; Man, 1999; Van Belzen et al., 2003). Dodnes nejsou známy funkce všech predispozičních genů ležících mimo HLA oblast, a proto nelze určit, jakou mají spojitost s CeD nebo HLA geny (Ludvig M. Sollid & Jabri, 2005). Navíc, podobně jako u mnoha jiných autoimunitních onemocnění, existuje slabá asociace CeD s polymorfismy genu *CTLA-4*. Není však jasné, zda se u všech autoimunit jedná o asociaci se stejnou genovou variabilitou (Ludvig M. Sollid & Jabri, 2005).

### **3.3. Vznik autoimunitní reakce u celiakie**

Jak již bylo řečeno, teorií vysvětlující vznik autoimunitní reakce CeD je mnoho, ale žádná zatím nebyla potvrzena. Doposud není přesně jasné, jakým způsobem je gluten rozpoznán a pohlcen pomocí APC. Avšak bylo potvrzeno, že gluten a od něho odvozené antigeny mohou být prezentovány makrofágy, DC a B lymfocyty (Ráki et al., 2006). Další kroky, které vedou k iniciaci autoimunitní reakce, jsou již popsány lépe (Tye-Din, Galipeau, & Agardh, 2018). Na glutenové antigenní peptidy vázané na molekuly HLA II. třídy reagují gluten specifické CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, které aktivují adaptivní specifickou odpověď (Beitnes et al., 2012).

Aktivované CD4<sup>+</sup> T lymfocyty začínají produkovat IFN- $\gamma$  a interleukin 21 (IL-21). Vzniká tak cytokinové mikroprostředí indukující cytotoxický fenotyp IEL (Bodd et al., 2010; Nouri-Shirazi et al., 2000; Palová-Jelínková et al., 2005; Ráki et al., 2006). Dále IEL exprimují vysoké hladiny receptorů, které aktivují buňky přirozené zabíječe (NK buňky, z anglického natural killer cells). Jsou to NK receptory jako např.: NKG2D a CD94/NKG2C. IEL posléze získávají cytolytický fenotyp a destruuje enterocyty (Meresse et al., 2004). Enterocyty vystaveny celkovému stresu začínají exprimovat stresové signály, např.: HLA-E a MIC-A (Hüe et al., 2004). Do procesu destrukce střevního

epitelu a zánětu tenkého střeva se rovněž zapojují další buněčné typy, jako jsou B lymfocyty (Lejeune, Meyer, & Abadie, 2021).

### **3.4. Monocyty a jejich role v rozvoji celiakie**

Monocyty tvoří asi 5 % všech leukocytů. Jedná se o velké jednojaderné buňky vznikající v kostní dřeni ze společného myeloidního prekursoru. Rozlišují se tři základní subpopulace monocytů. Tyto subpopulace se v literatuře nejčastěji rozdělují podle exprese povrchových molekul CD14 a CD16 (Wong et al., 2012). Receptor CD14 je glykoprotein zapojený do signalizačních drah, které rozpoznávají antigenní vzory spojené s patogeny (PRR, z anglického pattern recognition receptor). Je schopen vázat zejména lipopolysacharidy (LPS) (Wright et al., 1990). Vazba antigenu na tento receptor spouští prozánětlivou reakci (Triantafylou & Triantafylou, 2002). Receptor CD16 je také označován Fcγ receptor-III pro IgG (FcγRIII). Tento receptor by se mohl podílet na aktivaci degranulace (Fossati, Moots, Bucknall, & Edwards, 2002) a fagocytózy (Butcher et al., 2001).

Klasické monocyty jsou typické vysokou expresí molekuly CD14, značí se CD14<sup>++</sup>, a velice nízkou expresí molekuly CD16, značí se CD16<sup>-</sup> (Wong et al., 2011). V literatuře panuje shoda, že klasické monocyty mají důležitou roli v antimikrobiální reakci. Tento typ má schopnost diferencovat do makrofágů odvozených od monocytů, dendritických buněk odvozených od monocytů a podílet se na tlumení infekce ve tkáních (Menezes et al., 2016).

Intermediární monocyty mají fenotyp CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup>. Tato monocytární subpopulace vykazuje nejvyšší přirozenou expresi molekul HLA II. třídy (Wong et al., 2011) a dalších receptorů nezbytných pro interakci s T lymfocyty (CD40, CD54). Molekula CD40 se nachází na APC a po vazbě se svým protějškem, ligandem, CD40L na T lymfocytech umožňuje aktivaci těchto buněk (Ma & Clark, 2009). Molekula CD54, mezibuněčná adhezní molekula 1 (ICAM1, z anglického intercellular adhesion molecule 1), je povrchový glykoprotein imunitních a endoteliálních buněk umožňující mezibuněčný kontakt vazbou na integriny ze skupiny CD11. Dalším znakem této populace může být zvýšená exprese povrchové molekuly CD64 (také označován FcγRI) (Krüger, Büning, & Schriever, 2001). Společně s neklasickým typem mohou hrát roli v buněčné aktivaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (Wong et al., 2012; Zawada et al., 2011).

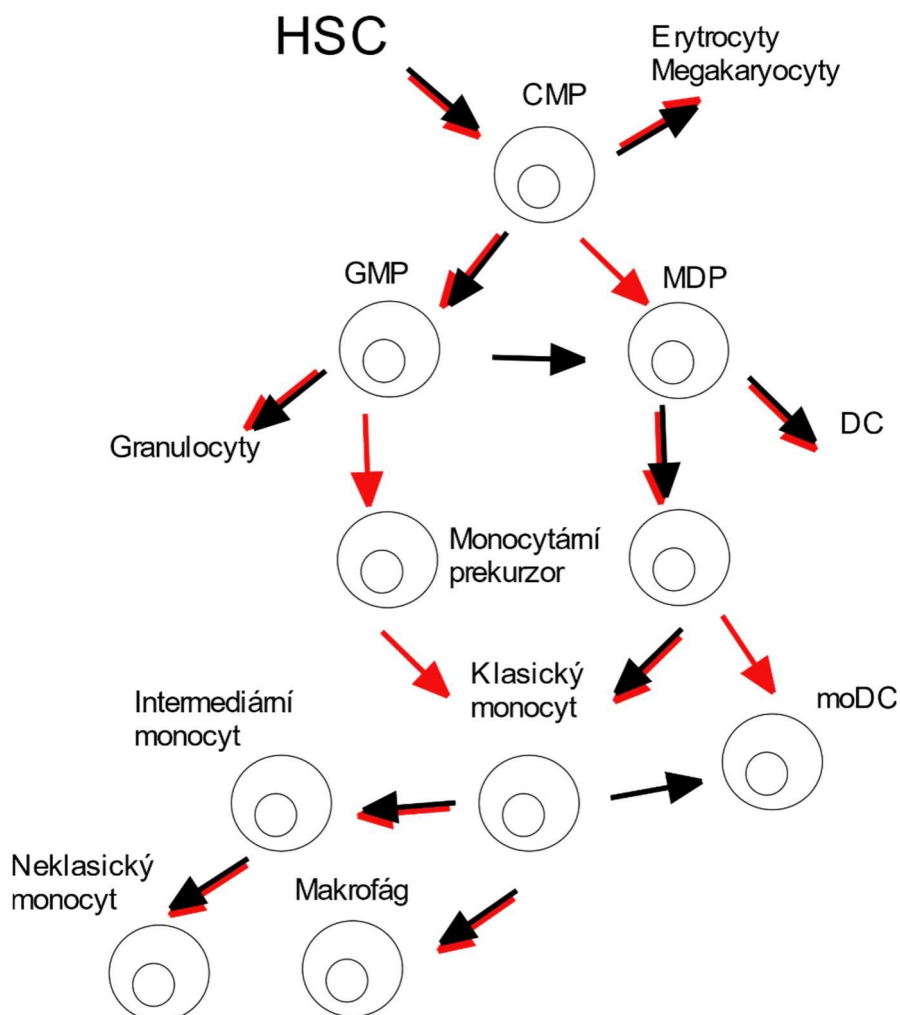
Neklasické monocyty mají fenotyp CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup>. Podobně jako intermediární subpopulace, i neklasické monocyty mají vysokou expresi HLA II. třídy. Jedná se pravděpodobně o znak spojený s vyšší expresí molekuly CD16. Funkcí této monocytární subpopulace je imunitní dohled (z anglického patrolling). Ze všech typů tato populace vykazuje nejvyšší míru přestaveb cytoskeletu (Wong et al., 2011), které jsou spojeny se zvýšenou motilitou.

Všechny tyto subpopulace představují vývojovou řadu, která začíná v kostní dřeni, kde diferencuje z monoblastu klasických monocyt, který se dostává do krevního řečiště (Kapellos et al., 2019). Odtud migruje do tkání a vzniká makrofág / DC, nebo v krevním řečišti zůstává a postupně diferencuje přes intermediární k neklasickému monocytu (Ozańska, Szymczak, & Rybka, 2020).

Zvláštní pozornost byla věnována kvantitativnímu zastoupení jednotlivých subpopulací. Klasické monocyty tvoří přibližně 70-80 % ze všech monocytárních subpopulací měřených v periferní krvi. Zbýlých až 30 % tvoří intermediární a neklasické monocyty. U některých autoimunitních chorob byla pozorována změna v těchto poměrech (Varol et al., 2007; Yona et al., 2013). Zvýšená hladina intermediárních monocytů byla detekována u aktivní Crohnovy choroby (Grip, Bredberg, Lindgren, & Henriksson, 2007), revmatoidní artritidy (Rossol, Kraus, Pierer, Baerwald, & Wagner, 2012) i Ealesovy nemoci (Sen et al., 2011). V případě CeD tato problematika nebyla studována, ale bylo prokázáno, že gliadinové peptidy aktivují monocyty periferní krve (Cinova et al., 2007). U pacientů s aktivní CeD byla pozorována zvýšená produkce cytokinů HLA-DQ2<sup>+</sup> monocyty po stimulaci gliadinem ve srovnání s HLA-DQ2<sup>+</sup> monocyty zdravých dárců (Cinova et al., 2007).

Alternativní teorie popisuje vznik monocytů a jejich subpopulací odlišným způsobem i z odlišných prekurzorů (Wolf et al., 2019)(obr. 2). Podporu tomuto modelu dávají výsledky, které ukazují, že tkáňově specifické makrofágy vznikají již v průběhu embryonálního období z prekurzorů vznikajících ve žloutkovém váčku či později ve fetálních játrech. Tyto makrofágové populace jsou navíc schopny se samy udržovat. Tento alternativní model říká, že monocyty mohou vznikat v kostní dřeni ze dvou odlišných prekurzorů: granulocyty-monocytárního (GMP) a monocyt-dendritického (MDP). Oba tyto prekurzory dávají vznik klasickým monocytům, z kterých se postupně diferencují neklasické. Na rozdíl od prvního modelu zde je předpoklad, že dendritické buňky vznikají z monocytů pocházejících z MDP a že na základě stimulu jsou preferenčně vyplavovány z kostní dřene monocyty vznikající z GMP nebo MDP.

Oba modely se shodují, že existují tři monocytární subpopulace, z nichž se mohou diferencovat dendritické buňky fenotypově a funkčně podobné konvenčním či plazmacytoidním dendritickým buňkám.



**Obrázek č. 2, Vývoj monocytů a dendritických buněk.** Černé šipky znázorňují klasický model vývoje buněk v kostní dřeni. Červené šipky ukazují aktualizovaný alternativní pohled na schéma vývoje daných buněčných typů. (HSC) hematopoetická kmenová buňka, (CMP) myeloidní prekursor, (GMP) granulocyty-monocytární prekursor, (MDP) monocyty-dendritický prekursor. Převzato a upraveno z (Kapellos et al., 2019; Ożańska et al., 2020; Wolf, Yáñez, Barman, & Goodridge, 2019).

### 3.5. Subpopulace dendritických buněk a interakce s lymfocyty

Dendritické buňky (DC), exprimující geny HLA II. třídy, tvoří heterogenní skupinu buněk prezentujících antigen a jsou klíčovými zprostředkovateli vazby mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Podílí se i na regulaci imunitních odpovědí, a proto jsou potenciálními cíli pro terapeutické využití (Schlitzer, McGovern, & Ginhoux, 2015). DC byly původně popsány jako buňky s hvězdicovou morfologií schopné účinně aktivovat naivní T lymfocyty. Tento popis je dnes do určité míry neaktuální. Postupem času bylo objeveno několik podtypů DC, z nichž každý má odlišné fenotypové i funkční vlastnosti. Celá populace DC v organismu tvoří systém schopný třídit antigeny a spoluurčovat způsob imunitní odpovědi – aktivace / tolerance (Schlitzer et al., 2015).

Jak již bylo zmíněno výše, do této rozsáhlé skupiny buněk se zapojují i monocyty skrze intermediární či neklasickou subpopulaci, nebo diferenciací do makrofágů či DC.

V periferní krvi se běžně vyskytují tři základní subpopulace DC: konvenční CD1c+ DC (cDC1) a CD141+ DC (cDC2) a plazmacytoidní DC (pDC) (Ziegler-Heitbrock et al., 2010).

První cDC1 subpopulace se dá od ostatních subpopulací odlišit fenotypem CD414+, ale tuto diferenciační molekulu exprimuje více buněčných typů a je tedy k odlišení nedostatečná. cDC1 mají fenotyp CD141+CADM1+XCR1+CD26+CD14-CD127a-CD11b-CD11c-CD11c-. Zvláště exprese CD26 je pro tuto subpopulaci typická a konzervovaná napříč tkáněmi. Pravděpodobnou funkcí cDC1 je tzv. zkřížená prezentace antigenů (Villar & Segura, 2020).

Druhou cDC2 subpopulaci lze fenotypově odlišit podle fenotypového profilu CD1c+CD11c+SIRPa+CD172a+CD11b+FLT3+. Dermální cDC2 exprimují CD1a místo CD1c. V periferní krvi mohou cDC2 exprimovat kostimulační molekuly CD80, CD83 a CD86. Tato subpopulace hraje významnou roli při zánětu a účastní se aktivace CD4+ T lymfocytů. Jedná se o původní populaci DC, které byla přisouzena funkce prezentace antigenu.

Třetí pDC subpopulace má fenotyp CD11c-CD123+CD45RA+BDCA2+CD85g+FLT3+ a je hlavním producentem IFN-I a IFN-III (Dalod, Chelbi, Malissen, & Lawrence, 2014).

Další specifickou subpopulaci tvoří DC diferencované z monocytů (moDC). Doposud není jasné, z jaké subpopulace monocytů se diferencují. V literatuře se uvádí dva

možné zdroje: klasické CD14<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> nebo neklasické CD14<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> monocyty. Pravděpodobnou funkcí moDC je podpořit místně specifickou imunitní odpověď.

V případě CeD byla objevena v *lamina propria* tenkého střeva specifická subpopulace DC. Fenotyp této subpopulace byl stanoven jako HLA-DQ2+CD11c+CD68-CD1c-BDCA3<sup>-</sup>. Spolu s touto subpopulací DC byly přítomny v *lamina propria* i makrofágy a B lymfocyty. Avšak tato HLA-DQ2+CD11c+CD86+CD68-CD1c-BDCA3<sup>-</sup> populace DC vykazovala nejvyšší efektivitu v prezentaci antigenů a aktivaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Ráki et al., 2006).

### 3.6. T regulační lymfocyty

Regulační T lymfocyty (Treg) jsou významnou subpopulací CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, která zajišťuje imunologickou toleranci a kontroluje rozvoj autoimunitních reakcí (Longhi et al., 2004; Sakaguchi, Fukuma, Kuribayashi, & Masuda, 1985; Takahashi et al., 2000). Treg představují asi 5-10 % periferních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. Sakaguchi et al. zjistili, že Treg exprimují vysoce afinitní receptor pro IL-2 (CD25) a transkripční faktor, forkhead box P3 (Foxp3), který hraje klíčovou roli ve funkci a vývoji Treg (Fontenot, Gavin, & Rudensky, 2017). Mutace genu *FOXP3* vede k autoimunitnímu onemocnění, známé jako IPEX syndrom, které je charakteristické imunitní dysregulací, polyendokrinními, enteropatiemi, a vázané na chromozom X (Bennett et al., 2001). Defekty Treg jsou zdokumentovány u řady autoimunitních chorob: roztroušená skleróza (Viglietta, Baecher-Allan, Weiner, & Hafler, 2004), psoriáza (Nussbaum, Chen, & Ogg, 2021), či systémový lupus erythematosus (Ohl & Tenbrock, 2015). Foxp3 je používán k detekci Treg populace. Avšak jedná se o intracelulární znak a je tedy hůře detekovatelný než běžné povrchové znaky (W. Liu et al., 2006).

V současnosti se rozlišují dva typy Foxp3+CD25+CD4<sup>+</sup> Treg: 1) přirozené Treg (nTreg) vyskytující se v thymu, a 2) indukované Treg (iTreg) pocházející z periferních T lymfocytů Foxp3-CD25-CD4<sup>+</sup> a vznikající po stimulaci transformujícím růstovým faktorem  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Ghali, Alikhan, Holdsworth, & Kitching, 2017; Shevach, Davidson, Huter, DiPaolo, & Andersson, 2008). Bohužel nejsou k dispozici spolehlivé markery pro rozlišení těchto dvou typů Treg. Některé znaky se zdají být slibné, např.: Helios, Neuropilin 1 (Ghali et al., 2017). Neuropilin 1 se zda být pro určení nTreg přesnější než Helios (Yadav et al., 2012).

Obyčejně je přijímán názor, že nTreg jsou anergické a neproliferující (Takahashi et al., 1998; Yamazaki et al., 2003). K jejich proliferaci dochází až při kultivaci se zralými DC (Bhattacharya, Gopisetty, Ganesh, Sheng, & Prabhakar, 2011). DC vznikající v kostní dřeni byly prokázány jako nejefektivnější DC pro stimulaci Treg (Yamazaki et al., 2003). Důležité, v kontextu této práce, jsou výsledky popisující, že pro efektivní stimulaci iTreg je důležitá exprese kostimulačních molekul CD80, CD86 na povrchu zralých buněk společně se suplementací IL-2 (Kanamori, Nakatsukasa, Okada, Lu, & Yoshimura, 2016). Potenciál pro klinické využití ukázal výzkum na zvířecím modelu neobězního diabetického kmene myši (NOD), kde Treg, které byly získány z BDC2.5 CD4<sup>+</sup> TCR transgenických NOD myši, kultivované spolu se zralými DC dokázaly zastavit rozvoj diabetu 1. typu (Petzold, Riewaldt, Koenig, Schallenberg, & Kretschmer, 2010; Tarbell et al., 2007). Zatímco přímý mezibuněčný kontakt mezi APC a T lymfocyty prostřednictvím vazby HLA-TCR je dobře charakterizován (Kumar & Sercarz, 2001), odpověď Treg na extracelulární exozomy v kontextu ztráty tolerance vůči lepku nebyla doposud studována.

### **3.7. Extracelulární transport a buněčná signalizace**

Je známo, že většina buněk produkuje extracelulární váčky (EV). Do nedávna bylo přijímáno, že tyto váčky mají hlavně odpadní funkci a že do nich buňky soustřeďují nepotřebné a nadbytečné složky buněčných metabolitů. Avšak v poslední době se ukazuje, že se do těchto váček soustřeďují i molekuly se signálním potenciálem, jako například: DNA, RNA, proteiny a lipidy (Kalluri & LeBleu, 2020). Zejména pro transport RNA s regulační funkcí, jako jsou dlouhé nekódující RNA (lncRNA, z anglického long non-coding RNA), byly objeveny speciální lokalizační motivy pro cílený přesun těchto molekul do exozomů a následný extracelulární transport (ELM, z anglického extracellular localization motifs). ELM jsou známy celkem tři: 1. - ACCAGCCU; 2. - CAGUGAGC; 3. - UAAUCCCA (Batagov, Kuznetsov, & Kurochkin, 2011; O'Leary et al., 2015). Podle vzniku se dají extracelulární váčky rozdělit na ektozomy a exozomy.

Ektozomy vznikají vnějším odštěpováním váček od plazmatické membrány. Dělí se dále podle velikosti na mikrováčky, mikročástice a makrováčky s velikostí od 50 nm do 1 µm.

Exozomy jsou váčky velké od 40 nm do 160 nm vznikající dvojitou invaginací buněčné membrány. Endocytózou dochází k tvorbě časného endozomu obsahující cizorodé

částice. Poté se z časného stává pozdní endozom. V průběhu této změny jsou do endozomu transportovány molekuly z intracelulárního prostředí a Golgiho aparátu. Kromě toho se v endozomu tvoří další malé váčky a postupně vzniká multiváčkové tělísko (MVB, z anglického multivesicular body). Nakonec membrána MVB splývá s buněčnou membránou a váčky obsažené v MVB jsou vyplaveny jako exozomy do extracelulárního prostředí. Obsah exozomů se liší podle stavu diferenciací a typu buňky, v které jsou tvořeny. Čím dál více se ukazuje, že právě exozomy se mohou podílet na buněčné komunikaci, a to zejména v imunitním systému (Kowal et al., 2016). Hrají nejen roli při zahájení imunitní odpovědi, ale i při jejím tlumení a nastavení antigenní tolerance přes indukci Treg. Hlavními povrchovými znaky exozomů jsou CD81, CD9 a CD63. Exozomy lze dělit podle velikosti, obsahu, funkce a původu.

Ačkoli exozomy mohou nést povrchové molekuly s imunomodulačním efektem, jako jsou CD81 či HLA, nebyla pozorována v minulých 50 letech při krevních transfúzích žádná negativní reakce; a to i v případě, kdy nebyla shoda v HLA systému. Na základě nejnovějších poznatků jsou tak exozomy velmi nadějným prostředkem nejen pro diagnostiku zánětlivých chorob a nádorů, ale i pro terapeutické využití.

APC patří mezi buňky produkující exozomy (Buschow et al., 2009; Nolte-'t Hoen, Buschow, Anderton, Stoorvogel, & Wauben, 2009; Théry et al., 2001; Zitvogel et al., 1998). Jejich exozomy navíc obsahují komplexy HLA-antigenní peptid a kostimulační molekuly, a proto se podílí na prezentaci antigenního peptidu T lymfocytům. Antigen prezentující a stimulující funkce exozomů byla potvrzena pro řadu chorob. U nádorových onemocnění bylo popsáno, že exozomy, které nesly antigeny specifické pro nádor, stimulovaly cytotoxické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. V případě bakteriální infekce, exozomy produkované APC, které nesly antigeny specifické pro bakteriálního původce infekce, měly stimulační efekt na CD4<sup>+</sup> T lymfocyty (Raposo et al., 1996; Théry et al., 2001; Wubbolts et al., 2003). Přesto, že exozomy mají schopnost stimulovat lymfocyty, přímá interakce mezi APC a T lymfocyty prostřednictvím vazby HLA-TCR vede k efektivnější stimulaci.

Exozomy mohou také obsahovat antigeny nenavázané na HLA s imunomodulační funkcí pro cílovou buňku (jiná APC, B a T lymfocyt), nebo různé molekuly RNA, např. siRNA, miRNA, lncRNA, které pravděpodobně mají vliv na regulaci genové exprese v cílové buňce.

#### 4. VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE

Tato práce si klade za cíl ukázat model dendritických buněk derivovaných z monocytů jako adekvátní pro studium exprese molekul HLA II. třídy z mnoha úhlů výzkumu v kontextu autoimunitní choroby celiakie.

Konvenční způsob aktivace imunitního systému zahrnuje prvotní reakci buňky prezentující antigen na cizorodou částici, která vede k přímému kontaktu této buňky s T lymfocytem. Takový kontakt, který je zprostředkován vazbou HLA-TCR, představuje můstek mezi vrozenou a adaptivní složkou imunitního systému. Kaskáda dějů vedoucí k eliminaci patogenu, ale zároveň zaručující optimální udržování homeostázy začíná aktivací, zráním a diferenciací různých buněčných typů. Jeden z prvních kroků reakce imunitního systému je zrání monocytů a jejich postupná diferenciaci do dalších monocytárních subpopulací, nebo transformace do makrofágů či dendritických buněk. Dalším krokem je vazba s antigenem a jeho zpracování, která vede k zrání buňky prezentující antigen a její komunikaci s T lymfocyty. Tato komunikace přes HLA-TCR se neomezuje jen na přímý kontakt zúčastněných buněk. Na základě současného poznání může probíhat i přes extracelulární transport.

Cílem této práce je analyzovat subpopulace monocytů u pacientů s celiakií a jejich schopnost se transformovat do zralých dendritických buněk po kontaktu s gliadinem. Dále se práce zaměřuje na objasnění úlohy exozomů při aktivační i inhibiční stimulaci T lymfocytů, tedy se zabývá indukcí transformace na T regulační lymfocyty. Poslední, ale nejdůležitější část práce se věnuje studiu role exprese molekul HLA II. třídy při extracelulární komunikaci.

## 5. STANOVENÍ HYPOTÉZ

Antigen prezentující buňky (APC) představují iniciační krok pro rozvoj autoimunitního onemocnění celiakie. Na základě rozpoznání gliadinu dochází k zrání dendritických buněk a prezentaci komplexu „HLA-DQ - antigenní peptid“ autoreaktivním T lymfocytům. Gliadin-specifické T lymfocyty představují až druhý bod selhání tolerance. V rámci této práce byly stanoveny následující hypotézy:

- Specifické proporční složení monocytárních subpopulací predisponuje k vzniku prozánětlivého prostředí.
- Zralé dendritické buňky pacientů s celiakií jsou efektivnější v aktivaci T lymfocytů po stimulaci gliadinem. Tento rozdíl je patrný ve srovnání se zdravými dárči.
- Exozomy produkované dendritickými buňkami po stimulaci gliadinem mají schopnost indukce T regulačních lymfocytů a pomáhají nastavení potravinové tolerance v případě zdravých dárců. U pacientů s celiakií jsou exozomy dysfunkční.

## **6. POPIS POUŽITÝCH EXPERIMENTÁLNÍCH METOD, VČETNĚ STATISTICKÝCH**

### **6.1. Klinická data, CeD diagnóza a popis členů studovaných rodin**

CeD byla diagnostikována podle aktuálních diagnostických kritérií. Byla měřena hladina celkového sérového IgA a specifického TGA-IgA. Pokud byl TGA-IgA 2-10krát vyšší než horní hranice normy ( $10 \times \text{ULN}$ ), byla provedena bioptická diagnostika (Husby et al., 2020). Písemný informovaný souhlas byl získán od všech osob zapojených do této studie se souhlasem Etické komise Institutu klinické a Experimentální Medicíny a Thomayerovy nemocnice, Praha, Česká republika (číslo schválení G-18–23). Do této studie bylo zařazeno celkem 15 účastníků ( $n = 15$ ), kteří byli rozděleni do následujících tří skupin: pacienti s CeD na GFD ( $n = 4$ ); pacienti s autoimunitním onemocněním štítné žlázy (ATH) ( $n = 4$ ); zdraví jedinci bez známek autoimunitního onemocnění, zánětu nebo malignity ( $n=7$ ). Všichni dárci byli občané ČR evropského původu. Z hlediska příbuzenského vztahu byli dárci členy tří rodin značených: F-A, F-B a F-C. Jednotlivé rodiny byly strukturovány takto: F-A byla třígenerační se 7 členy, F-B byla dvougenerační se 4 členy, F-C byla rovněž dvougenerační se 4 členy.

### **6.2. Izolace monocytů z periferní krve**

Periferní krev byla dárčům odebrána na Ústavu lékařské genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Po odběru byla zpracována do 8 hodin. Nejprve byla zředěna v poměru 1:1 médiem RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, USA.). Následně byla navrstvena na Ficoll-Paque (GE HealthCare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko) v 50 ml konické zkumavce. Zředěná krev ku Ficoll-Paque byla v poměru 4:3. Takto připravený vzorek byl centrifugován při  $400 \times g$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 30 min. Tímto způsobem došlo ke gradientové separaci krve na několik vrstev: plazma, jednojaderné buňky periferní krve (PBMC, z anglického peripheral blood mononuclear cells), Ficoll-Paque, granulocyty, erytrocyty. PBMC byly opatrně odseparovány a promyty v RPMI 1640 mediu (centrifugace při  $400 \times g$ ,  $20^\circ\text{C}$ , 20 min). Po centrifugaci byly vzorky PBMC obarveny trypanovou modří, pozorovány pod světelným mikroskopem a počítány v Bürkerově komůrce. Celkem  $10^6$  buněk PBMC bylo následně kultivováno v plastové kultivační nádobě o objemu  $75 \text{ cm}^3$

(Schoeller Pharma, Praha, Česká republika) při 37°C, atmosféře 5% CO<sub>2</sub> po dobu 2 h v kultivačním mediu 1 (KM1) obsahujícím: RPMI 1640 medium - 90 ml (Sigma-Aldrich, MO, USA), fetální bovinní sérum - 10 ml (FBS; Sigma-Aldrich, MO, USA) / fetální bovinní sérum ochuzené o exozomy - 10 ml (FBSeF; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, kat.č. A2720801), antibiotický antimykotický roztok - 1 ml (Sigma-Aldrich, MO, USA) (Tab. 1). Po 2 h kultivaci byla odstraněna neadherentní frakce promytím za použití media KM1.

**Tabulka č. 1, Složení kultivačních medií.**

| <b>Kultivační medium</b> | <b>Obsah media</b>                                                                                             |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>KM1</b>               | RPMI 1640 medium - 90 ml,<br>FBS / FBS ochuzené o exozomy - 10 ml,<br>antibiotický antimykotický roztok - 1 ml |
| <b>KM2</b>               | KM1 – 10 ml,<br>IL-4 (200 ng/ml),<br>GM-CSF (500 ng/ml)                                                        |
| <b>KM3</b>               | KM2,<br>LPS (100 ng/ml)/ PTG (1 mg/ml),<br>exozomy + buněčné produkty a metabolity                             |

### **6.3. Kultivace a diferenciacie dendritických buněk z monocytů, sběr růstového media**

Adherentní monocyty byly kultivovány v kompletním mediu 2 (KM2), obsahujícím: KM1 10 ml; IL-4 - 200 ng/ml (Sigma-Aldrich, MO, USA); faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů - 500 ng/ml (GM-CSF, z anglického granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), 6 dní při 37°C, atmosféře 5% CO<sub>2</sub> v kultivační nádobě o objemu 75 cm<sup>3</sup> (Schoeller Pharma, Praha, Česká republika). KM2 bylo vyměněno 3. den. Diferencované nezralé neadherentní dendritické buňky byly 6. den přeneseny z kultivační nádoby do 6 jamkových kultivačních destiček (Schoeller Pharma, Praha, Česká republika). Zrání dendritických buněk bylo indukováno přidáním lipopolysacharidu - 100 ng/ml (LPS; Sigma-Aldrich, MO, USA), nebo gliadinových peptidů - 1 mg/ml (PTG, z anglického pepsin-trypsin digested gliadin peptides) do KM2 a kultivací 24 h při 37°C, atmosféře 5% CO<sub>2</sub>.

PTG byly generovány následujícím způsobem: gliadin (100 mg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA) a pepsin (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA) byly rozpuštěny v 0,2 M HCl (Sigma-Aldrich, MO, USA) a inkubovány po dobu 2 h při 37°C s úpravou pH na 7,4 před přidáním trypsinu (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, MO, USA). Po přidání trypsinu byl roztok inkubován s magnetickým míchadlem po dobu 4 h při 37°C, 250 otáček/min. Enzymatická reakce byla zastavena inkubací při 100°C po dobu 30 min. PTG fragmenty byly rozděleny na 10 ml alikvoty a zmrazeny při -20°C.

Zralé dendritické buňky byly centrifugovány při 400 x g, 20°C, 5 min. Buněčný sediment byl použit k analýze na průtokovém cytometru (viz níže). Zbylé medium KM2 bylo centrifugováno při 1000 x g, 20°C, 30 min pro odstranění zbytku buněk. Výsledný bezbuněčný supernatant obsahující exozomy (KM3) byl zamražen při -80°C pro další analýzu.

#### **6.4. Izolace T lymfocytů z periferní krve a kultivace v růstovém mediu**

Periferní krev od zdravých dárců (CTL) byla odebrána stejným způsobem jako při izolaci PBMC na Ústavu lékařské genetiky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Aby se zabránilo internalizaci molekuly CD3, byla plná krev umístěna na led. CD3<sup>+</sup> T lymfocyty byly izolovány pomocí magnetických kuliček podle protokolu výrobce (Dynabeads® FlowComp™ Human CD3, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, kat.č. 11365D). Protilátka anti-CD3 FlowComp™ (12,5 µl / ml plné krve) byla přidána přímo do antikoagulované krve na ledu a vzorek byl inkubován po dobu 10 min. Potom byl přidán izolační pufr (20 ml; PBS bez Ca<sup>2+</sup> a Mg<sup>2+</sup> doplněný o 0,1 % BSA a 2 mM EDTA) a vzorek byl centrifugován při 350 x g, 20°C, 15 min. Supernatant byl odstraněn a peleta byla pečlivě rozmíchána ve 375 µl FlowComp™ Dynabeads®. Následně byl vzorek inkubován na horizontálním rotoru po dobu 15 min při 20°C. Pak byl ke vzorku přidán izolační pufr a vzorek byl umístěn na magnet po dobu 3 min. Supernatant obsahující CD3 negativní buňky byl odstraněn. Vzorek pelety obsahující CD3 pozitivní buňky byl rozmíchán v pufru FlowComp™ Release Buffer, inkubován po dobu 10 min při 20°C a znovu umístěn na magnet po dobu 3 min. CD3<sup>+</sup> T lymfocyty byly izolovány ze supernatantu centrifugací při 350 x g, 20°C, 8 min. Peleta obsahující CD3<sup>+</sup> T lymfocyty byla rozmíchána v kultivačním mediu KM3 obsahující exozomy produkované zralými dendritickými buňkami. Kultivace probíhala 6 dní při 37°C a atmosféře 5% CO<sub>2</sub>

v 24 jamkové kultivační destičce (TPP, Trasadingen, Švýcarsko). T lymfocyty byly centrifugovány při 400 x g, 20°C, 5 min. Buněčný sediment byl použit k analýze na průtokovém cytometru. Zbylé medium bylo centrifugováno při 1000 x g, 20°C, 30 min pro odstranění zbytku buněk. Výsledný bezbuněčný supernatant byl použit na analýzu produkce IL-2 metodou ELISA (viz níže).

## **6.5. Kokultivace moDC a T lymfocytů**

Zralé dendritické buňky ( $1 \times 10^5$  buněk / jamka) a CD3+ T lymfocyty ( $1 \times 10^6$  buněk / jamka) byly kultivovány dohromady po dobu 6 dní při 37°C a atmosféře 5% CO<sub>2</sub> v 24 jamkové kultivační destičce (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) v kultivačním mediu KM1. Na dno jamek kultivačních destiček byly nanášeny krycí sklíčka ošetřena poly-L-lysinem. Zpracování kultivovaných buněk probíhalo postupně 1., 3. a 6. den. Kultivace byla každý příslušný den ukončena odstraněním kultivačního media a promytím buněk pomocí PBS. Krycí sklíčka s buňkami byla fixována ve 4% paraformaldehydu po dobu 15 min. Poslední 6. den kultivace byla všechna fixovaná krycí sklíčka použita pro mikroskopickou analýzu interakce mezi dendritickými buňkami a CD3+ T lymfocyty na mikroskopu Olympus BX53M (Olympus, Tokio, Japonsko).

## **6.6. Detekce molekul HLA-DQ na T lymfocytech kultivovaných v růstovém mediu pomocí konfokální mikroskopie**

T lymfocyty, kultivované v kultivačním mediu KM3 (viz. podkapitola 6.4.) po dobu 6 dnů, byly fixované na krycích sklíčkách ošetřených poly-L-lysinem. Na konci kultivace byly promyty v PBS po dobu 5 min a permeabilizovány v TBS-T (TBS, 0,5% Triton™ X-100; Sigma-Aldrich, MO, USA) po dobu 1 h. Následovalo promytí v PBS po dobu 5 min a inkubace v blokovacím roztoku (TBS, 5% hovězí sérový albumin, 0,5% Triton™ X-100) po dobu 1 h při 20°C. Přes noc při 4°C byly T lymfocyty barveny pomocí protilátek konjugovaných s fluorochromem: FITC konjugovaný s anti-HLA-DQ (klon Tu169, koncentrace 1:100; BD Biosciences, CA, USA). Poté byly T lymfocyty třikrát promyty v PBS, vždy po dobu 15 min. Nakonec byla krycí sklíčka usušena při 20°C ve tmě, zafixována v ProLong® Gold Antifade roztoku (Cell Signaling Technology, MA, USA, kat.č.

8961S) obsahujícím DAPI a umístěna na mikroskopická podložní sklíčka. Analýza probíhala na inverzním konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu Leica TCS SP5 (DMI6000, Leica Microsystems, Mannheim, Německo) s použitím suchého objektivu HCX PL Fluotar lambda blue 40,0 x 0,75.

#### **6.7. Detekce IL-2 jako aktivačního signálu T lymfocytů pomocí metody ELISA**

T lymfocyty byly kultivovány v kultivačním mediu KM3 po dobu 6 dnů (viz podkapitola 6.4.). KM3 bylo následně odebráno a centrifugováno při 2000 x g po dobu 10 min, aby se odstranily zbylé buňky. Supernatant byl zpracován pomocí Human IL-2 SimpleStep ELISA® Kit (Abcam, Cambridge, UK, kat.č. ab270883) pro stanovení přítomnosti a koncentrace IL-2. Dále se postupovalo podle protokolu výrobce. Byly připraveny protilátky, standardy a Wash Buffer PT. Do jamek byly přidány vzorky nebo standardy, a potom směs protilátek. Po inkubaci byly jamky promyty, aby se odstranil nenavázaný materiál. Následná inkubace celého komplexu s enzymatickým roztokem umožnila HRP katalýzu a vytvoření modrého zbarvení. Reakce byla zastavena přidáním zastavovacího roztoku, čímž byla dokončena jakákoli změna barvy z modré na žlutou. Signál byl generován úměrně množství navázaného IL-2. Poté proběhlo měření optické density při vlnové délce 450 nm. Duplicitní hodnoty byly zprůměrovány pro standardy a vzorky.

#### **6.8. Analýza buněk průtokovou cytometrií**

Zralé dendritické buňky byly inkubovány s monoklonálními protilátkami (viz níže) přidáními podle doporučení výrobce po dobu 20 min při 4°C ve tmě. Byly použity následující anti-lidské monoklonální protilátky (EXBIO, Praha, Česká republika): PE konjugovaný s anti-CD86 (klon BU63), FITC konjugovaný s anti-CD14 (klon MEM-15), PerCP konjugovaný s anti-CD16 (klon 3G8), APC konjugovaný s anti-CD33 (klon WM53), PerCP konjugovaný s anti-CD11c (klon BU15), PE konjugovaný s anti-CD64 (klon 10.1) a APC konjugovaný s anti-HLA-DQ (klon SK10, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA/ ). Po inkubaci bylo provedeno další promytí (centrifugace při 400 x g, 20°C, 5 min.). moDC byly resuspendovány v PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) o teplotě 4°C a detekovány na průtokovém cytometru BD FACSVerse (BD Biosciences,

CA, USA). Data byla analyzována pomocí softwaru BD FACSuite™. Všechny obrázky a grafy byly vytvořeny a sestaveny pomocí GraphPad PRISM v3.0 a Inkscape v1.0.1.

Izolované T lymfocyty byly kultivovány po dobu 6 dnů na 24 jamkových kultivačních destičkách (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) v kultivačním mediu KM3 obsahujícím exozomy produkované zralými dendritickými buňkami při 37°C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub>. Poslední 6. den byly T lymfocyty odebrány z kultivační destičky a centrifugovány při 400 x g, 20°C, 5 min. Buněčná peleta byla resuspendována ve 100 µl media RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, USA) s monoklonálními protilátkami (viz níže) přidanými podle doporučení výrobce a inkubována po dobu 20 min při 4°C ve tmě. Byly použity následující monoklonální protilátky: FITC konjugovaný s anti-HLA-DQ (klon Tu169; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), PE konjugovaný s anti-CD127 (klon R34.34; Beckman Coulter Company, Brea, CA, USA), PC5 konjugovaný s anti-CD25 (klon B1.49.9; Beckman Coulter Company, Brea, CA, USA), PerCP konjugovaný s anti-CD3 (klon SK7; EXBIO, Praha, Česká republika), APC konjugovaný s anti-CD63 (klon MEM-259; EXBIO, Praha, Česká republika). Po inkubaci buněk s protilátkami byly vzorky promyty: bylo přidáno chlazené PBS a vzorky centrifugovány při 400 x g, 20°C, 5 min. Buněčná peleta byla resuspendována v chlazeném PBS. Vzorky byly uchovány v temnu na ledu a připraveny k okamžité analýze na průtokovém cytometru BD FACSVersé (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data byla analyzována pomocí softwaru BD FACSuite™. Všechny obrázky a grafy byly vytvořeny a sestaveny pomocí GraphPad PRISM v3.0 a Inkscape v1.0.1.

## **6.9. Analýza membránových antigenů pomocí konfokální mikroskopie**

Dendritické buňky byly kultivovány v kultivačních destičkách (viz podkapitola 6.3.) na krycích sklech ošetřených poly-L-lysinem. Po 24 hodinách indukce zrání pomocí LPS / PTG bylo kultivační medium odstraněno a dendritické buňky dvakrát promyty přidáním PBS, vždy po dobu 5 min. Potom byly vzorky fixovány ve 4% paraformaldehydu po dobu 15 min. Následovalo promytí přidáním PBS po dobu 5 min. Pak proběhla permeabilizace vzorků v roztoku TBS-T (TBS, 0,5% Triton™ X-100; Sigma-Aldrich, MO, USA) po dobu 1 h. Dále byly vzorky promyty přidáním PBS po dobu 5 min. Vzorky byly následně inkubovány v blokovacím roztoku (TBS, 5% hovězí sérový albumin, 0,5% Triton™ X-100) po dobu 1 h při teplotě 20°C. Poté byly vzorky barveny po dobu 2 h při 4°C

v temnu během inkubace s protilátkami: PE konjugovaný s anti-CD86 (1:100), APC konjugovaný s anti-HLA-DQ (1:100). Následovalo třikrát promytí přidáním TBS-T, vždy po dobu 15 min, a usušení při 20°C v temnu. Preparáty byly nakonec fixovány na podložní mikroskopické sklíčko pomocí činidla ProLong® Gold Antifade (Cell Signaling Technology, MA, USA, kat.č. 8961S) obsahujícím DAPI. Analýza probíhala na inverzním konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu Leica TCS SP5 (DMI6000, Leica Microsystems, Mannheim, Německo) s použitím objektivu HCX PL APO 30×/1,30 Oil. Obrazky byly analyzovány v softwaru LAS AF (Leica Microsystems, Mannheim, Německo) a softwaru ImageJ v1.53e (NIH, WA, USA). Všechny obrázky a grafy byly vytvořeny a sestaveny pomocí GraphPad PRISM v3.0 a Inkscape v1.0.1.

#### **6.10. Identifikace a analýza extracelulárních lokalizačních motivů (ELM) přítomných v genech HLA-DQA1 a HLA-DQB1**

Nukleotidové sekvence exonů alel genů HLA-DQA1 a HLA-DQB1, převzaté z databáze Immuno-Polymorphism Database-International Immunogenetics Project-Human Leukocyte Antigen (IPD-IMGT/HLA) (Maccari, Robinson, Hammond, & Marsh, 2020; Robinson, Halliwell, McWilliam, Lopez, & Marsh, 2013), byly použity pro stanovení přítomnosti nebo nepřítomnosti ELM. Při analýze byla zohledněna tyto kritéria: délka signální sekvence (nebyly hodnoceny fragmenty kratší než 5 bp) a počet repetice. Tato kritéria byla hodnocena zvlášť pro každý exon alel genů HLA-DQA1 a HLA-DQB1, zvlášť pro rizikové alely asociované s CeD a zvlášť pro alely s protektivním / neutrálním efektem. Nakonec byla vytvořena tabulka zobrazující přítomnost ELM v exonech alel těchto HLA genů.

#### **6.11. Statistická analýza**

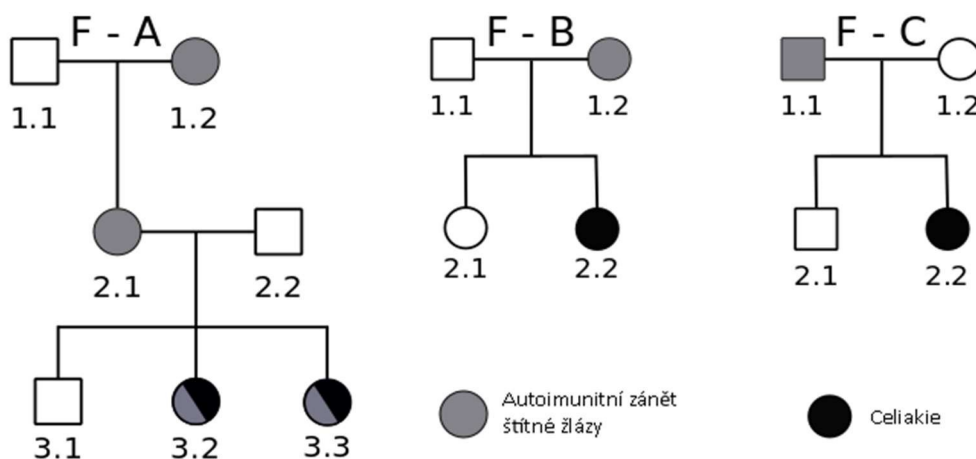
Statistické porovnání dat bylo provedeno pomocí neparametrického jednostranného Mann-Whitneyho U testu, dvoustranných Wilcoxonových párových znaménkových testů či Studentova t-testu pomocí GraphPad PRISM 3.0 nebo Microsoft Excel. Hodnoty  $p \leq 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

## 7. PŘEHLED DOSAŽENÝCH VLASTNÍCH VÝSLEDKŮ

### 7.1. Vysoká prevalence CeD v České republice představuje vyšší riziko rozvoje autoimunitního onemocnění u rodinných příslušníků napříč generacemi

Podle zjištění Světové gastroenterologické organizace (WGO, z anglického world gastroenterology organization) Global 2016 patří Česká republika mezi evropské země s vysokou prevalencí CeD (obr. 1). Nejvyšší výskyt CeD je zjištěn ve Finsku (2 %), v České republice je procentuální prevalence CeD 0,3 % (1 z 218 jedinců).

Předmětem této disertační práce byla imunogenetická studie, které se účastnily tři české rodiny (F-A, F-B, F-C) s anamnézou autoimunitního onemocnění. Přehled jejich rodokmenů je uveden na obrázku 3, přičemž izolovaný výskyt CeD u žen byl popsán ve druhých generacích rodin F-B a F-C. Ženy třetí generace F-A byly postiženy kombinací CeD a ATH. Z dostupných údajů se ukázalo, že CeD se většinou manifestovala ve druhé dekádě života, pouze u ženy z rodiny F-A se CeD rozvinula už v 5. roce života. U dvou členů rodin byla prokázána antigenní pozitivita vůči tyreoidální peroxidáze (TPO-ab). Celkem šest členů ze tří rodin mělo ATH.



Obrázek č. 3, Výsledky rodokmenové analýzy.

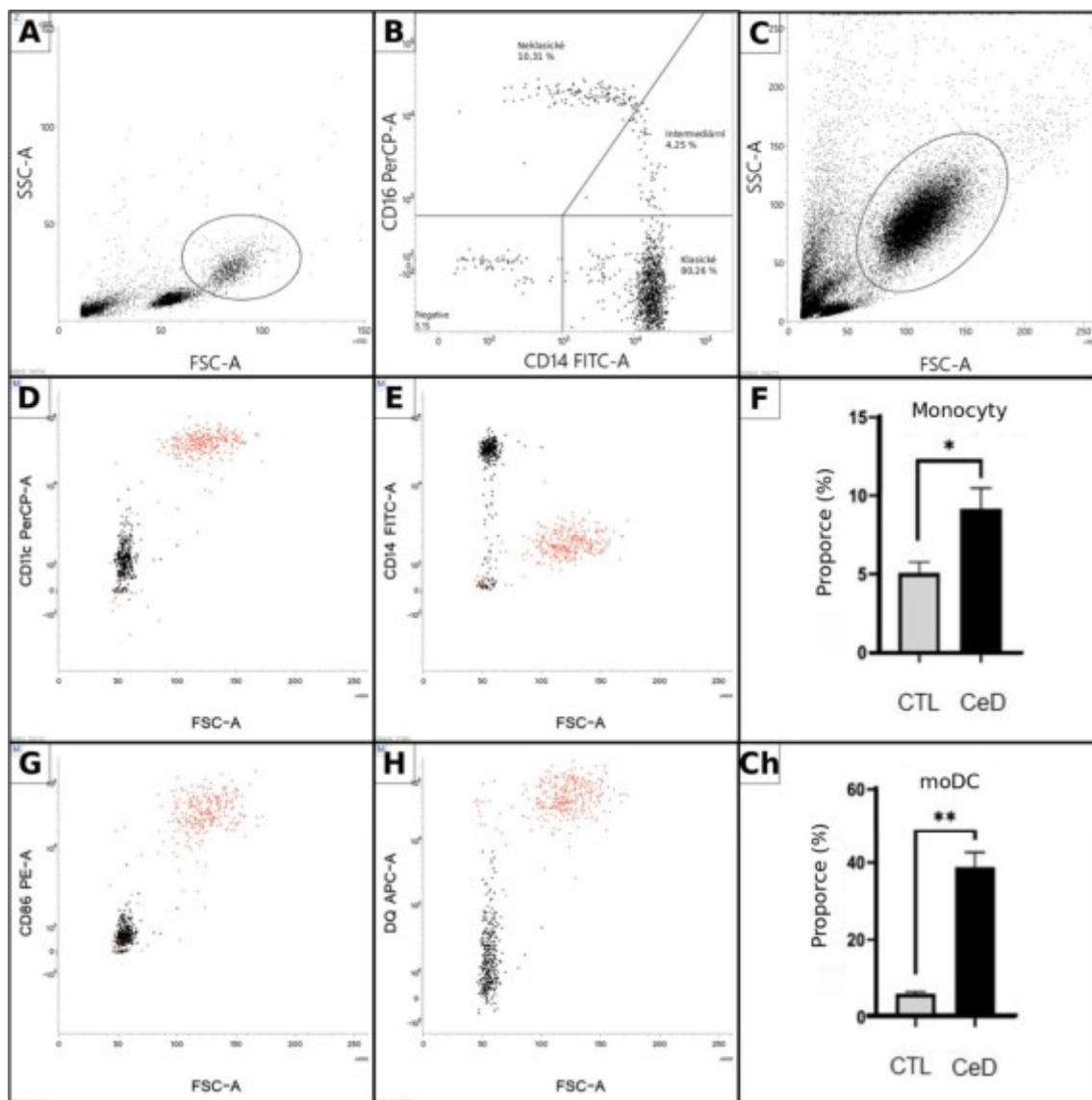
## **7.2. Odlišná exprese transmembránových znaků naznačuje, že monocyty CeD pacientů mají schopnost se diferencovat do DC po expozici LPS/PTG**

Monocyty patří mezi největší typ leukocytů. Jsou agranulocytární, mají kulovitý tvar a jednoduché velké jádro. Očekávaná a v literatuře běžně uváděná frekvence lymfocytů a monocytů v PBMC zdravých jedinců se pohybuje v rozmezí 70-90 % a 10-20 %. Monocyty izolované z PBMC od pacientů s CeD byly téměř ve standardním rozmezí ( $9 \pm 3$  %; obr. 4F), zatímco z PBMC od zdravých kontrol (CTL) byly mírně mimo něj ( $5 \pm 1$  %; obr. 4F). Monocyty izolované z PBMC od pacientů s ATH vykazovaly, podobně jako CTL, mírně sníženou frekvenci oproti standardu ( $4,5 \pm 1$  %, není ukázáno). Byly pozorovány statisticky významné rozdíly ve frekvenci monocytů mezi skupinami CTL vs. CeD ( $p = 0,0357$ ) a mezi skupinami ATH vs. CeD ( $p = 0,028$ ). Mezi skupinami ATH vs. CTL nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ve frekvenci monocytů ( $p = 0,267$ ). Populace monocytů byla stanovena na základě parametrů buněčné velikosti (analýza pří-  
měho rozptylu – FSC, z anglického forward scatter) a buněčné granularity odrážející slo-  
žitost, množství buněčných organel a členitost cytoplazmatické membrány (analýza boč-  
ního rozptylu – SSC, z anglického side scatter) na průtokovém cytometru (obr. 4A).

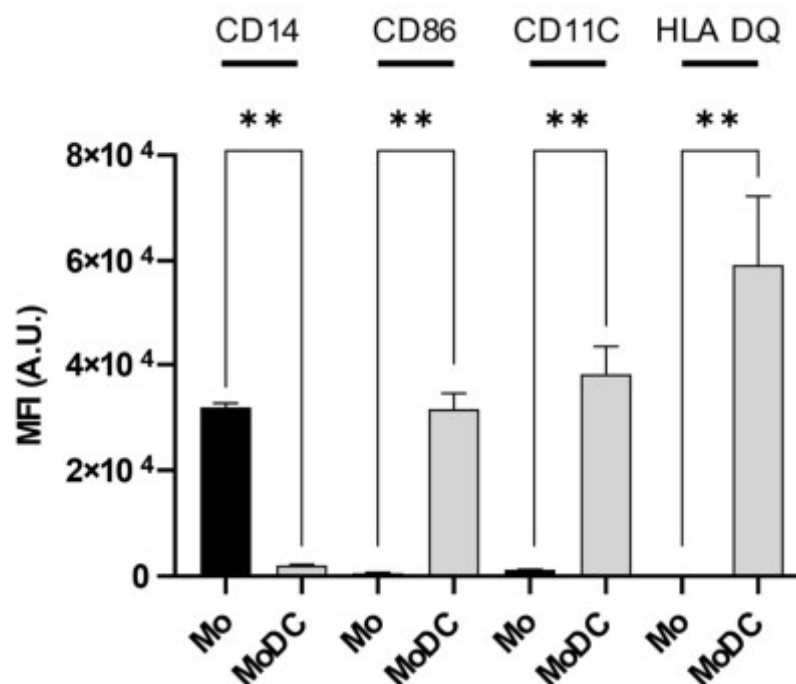
Dále byla analyzována schopnost monocytů se diferencovat na zralé dendritické buňky po stimulaci antigenem LPS / PTG (graf 1). Byla pozorována statisticky významně větší schopnost monocytů pacientů s CeD odpovídat na stimulaci antigenem LPS / PTG a diferencovat se na zralé dendritické buňky ( $p = 0,00083$ ) (Obr. 4Ch). Výsledky byly měřeny na průtokovém cytometru a hodnoceny pomocí parametrů FSC vs. SSC (Obr. 4C). U pacientů s CeD tvořily zralé dendritické buňky  $41 \pm 3$  % ze všech měřených událostí, což odpovídalo 4,2 násobku hodnot u CTL. Podobný stav byl pozorován mezi ATH vs. CeD (6,5 násobek hodnoty,  $p = 0,011$ ). Mezi ATH vs. CTL nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ve schopnosti diferenciaci dendritických buněk ( $p = 0,412$ ).

Monocyty byly charakterizovány jako klasické, intermediární a neklasické pomocí analýzy exprese povrchových znaků (obr. 4B). Výsledky ukázaly, že u pacientů s CeD byly CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> klasické monocyty přítomny v  $80,26 \pm 3$  %, CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> inter-  
mediární monocyty v  $4,28 \pm 2$  % a CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> neklasické monocyty v  $10,31 \pm 1$  %, zatímco  $5,15 \pm 0,5$  % buněk bylo negativních na CD16 i CD14 a jako takové nebyly charakterizovány. Při srovnání monocytárních subpopulací nebyl pozorován žádný sta-

tisticky významný rozdíl mezi skupinami CTL vs. CeD: CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> klasické monocyty ( $p = 0,4121$ ), CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> intermediární monocyty ( $p = 0,3152$ ) a CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> neklasické monocyty ( $p = 0,3152$ ).



**Obrázek č. 4. Analýza monocytyů a dendritických buněk průtokovým cytometrem. (A-C)** Výsledky analýzy monocytyů a dendritických buněk průtokovým cytometrem. (D,E,G,H) Porovnání kultivovaných monocytyů na počátku diferenciacce (černá) a dendritických buněk na konci kultivace (oranžová). (F) Statistické vyhodnocení analýzy monocytyů. (Ch) Statistické vyhodnocení analýzy dendritických buněk. Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ .

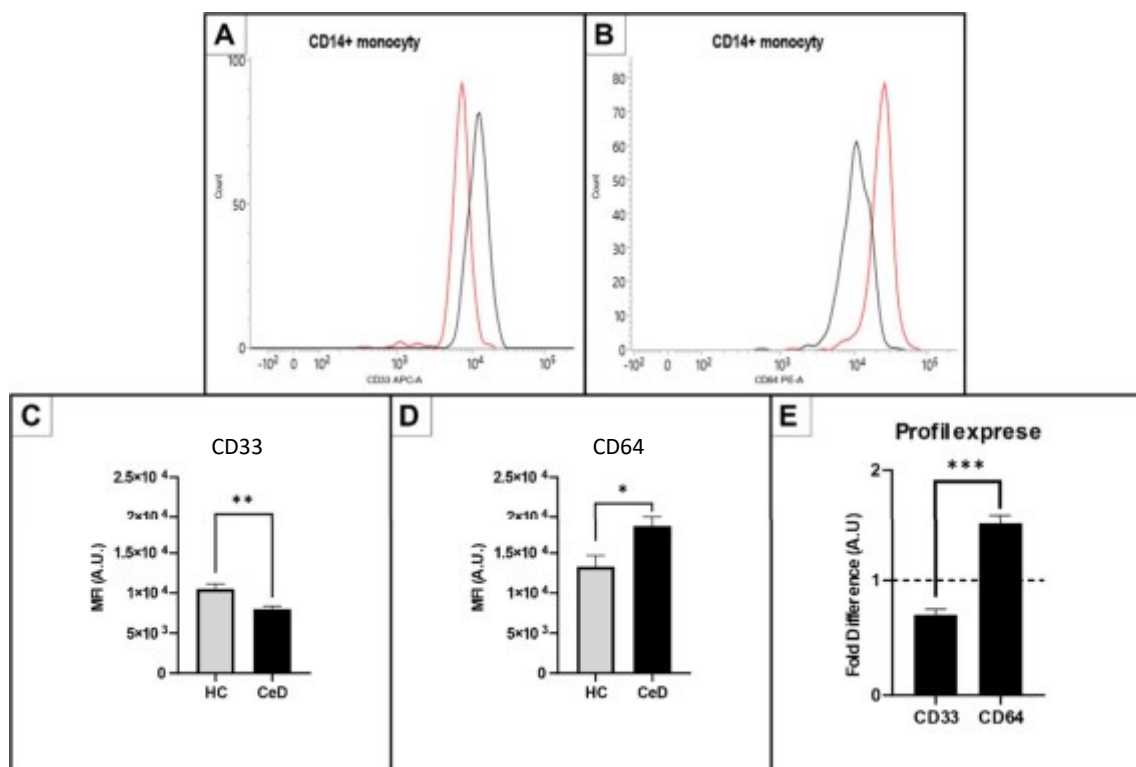


**Graf č. 1, Statistické zhodnocení diferenciacie monocyty do dendritických buněk.** Diferenciací dendritických buněk byla zvýšena exprese CD86, CD11c, HLA-DQ a snížena exprese CD14 v porovnání s monocyty. Znak \*\* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,005$ .

### 7.3. Identifikace nového expresního profilu CD33:CD64 u monocytů CeD pacientů

Transmembránový receptor CD33 je exprimován na buňkách, které vznikají z prekurzoru myeloidní řady. CD64 je integrální membránový glykoprotein, který je konstitutivně exprimován na monocitech a makrofázích (Akinrinmade et al., 2017). Po selekci podle úrovně exprese CD14 a CD16 (viz výše) byla u monocytů od pacientů s CeD analyzována exprese molekul CD33 a CD64 na průtokovém cytometru. U CD16<sup>+</sup> monocytů nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v expresi CD33 ( $p = 0,4020$ ) a CD64 ( $p = 0,3650$ ) mezi CeD vs. CTL. CD14<sup>+</sup> monocyty pacientů s CeD vykazovaly statisticky významně vyšší expresi CD64 ( $p = 0,0352$ ; obr. 5B, D) a statisticky významně nižší expresi CD33 ( $p = 0,0029$ ; obr. 5A, C) oproti CTL. U CD14<sup>+</sup> monocytů pacientů s CeD byla pozorována statisticky významná změna v expresním profilu, neboť exprimovaly

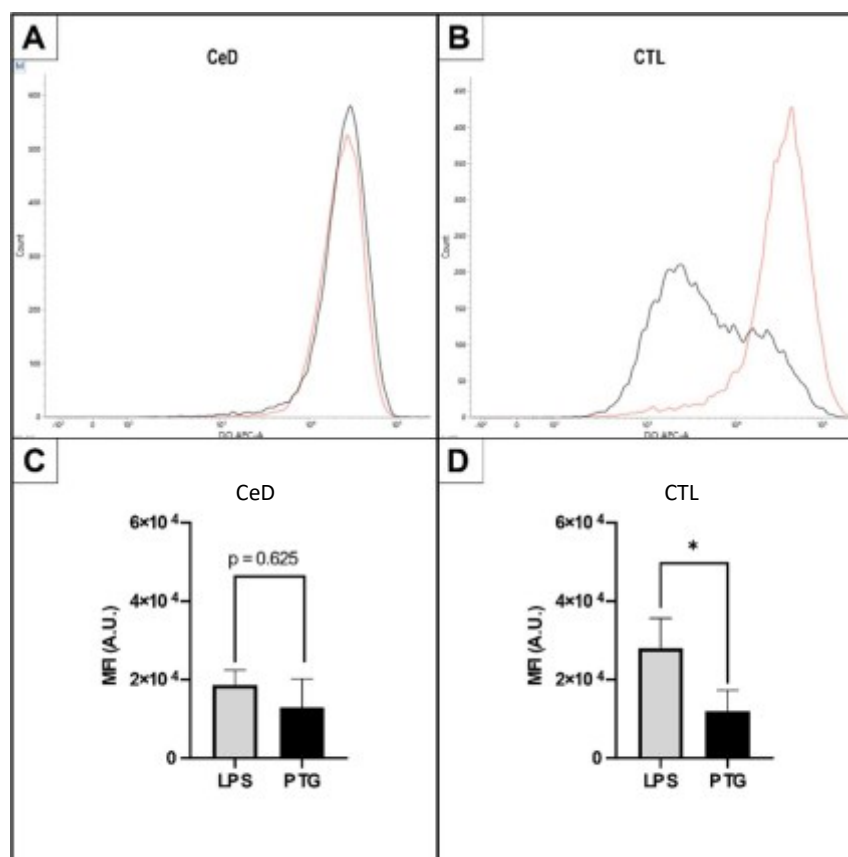
výrazně méně CD33 oproti CD64 ( $p = 0,00012$ ; obr. 5E), zatímco ve skupině CTL exprese těchto molekul měla podobnou intenzitu. Toto zjištění by mohlo být využito diagnosticky.



**Obrázek č. 5, Analýza fenotypového profilu exprese CD33 a CD64 na CD14+ monocytech.** Pacienti s CeD (oranžová), CTL (černá). Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ .

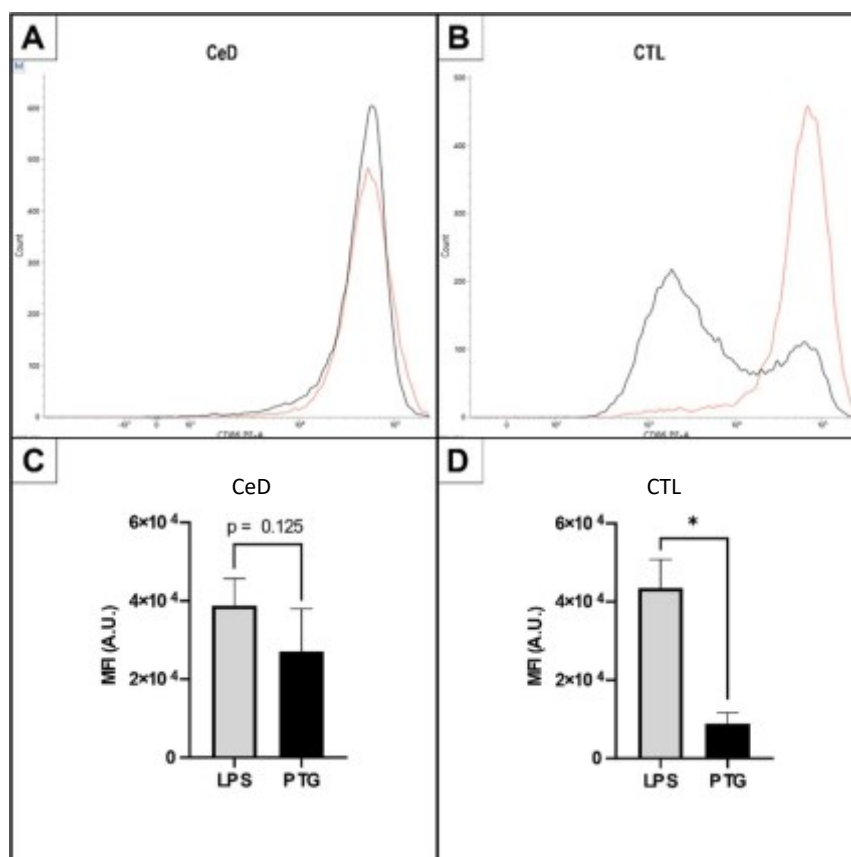
#### 7.4. Dendritické buňky CeD pacientů vykazují vyšší míru aktivace po kontaktu s gliadinem

Monocyty, charakterizované jako CD14+, se mohou diferencovat na makrofágy nebo dendritické buňky, pokud jsou vystaveny příslušnému cytokinovému prostředí. Diferencované nezralé dendritické buňky mají mnoho tenkých výběžků, pomocí kterých získávají antigeny ze svého okolí a lze je fenotypicky odlišit na základě zvýšené exprese receptoru umožňujícího mezibuněčnou adhezi (např.: CD11c) a snížené exprese monocytárního znaku CD14. Po rozpoznání molekul, které jsou asociované s patogeny (PAMP, z anglického pathogen-associated molecular patterns) či poškozením tkáně (DAMP, anglického damage-associated molecular patterns), dochází ke změnám v regulaci exprese typických znaků dendritických buněk. Tyto změny vedou ke vzniku diferencované zralé



**Obrázek č. 6, Analýza exprese HLADQ na povrchu dendritických buněk po stimulaci LPS (oranžová křivka) / PTG (černá křivka). Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ .**

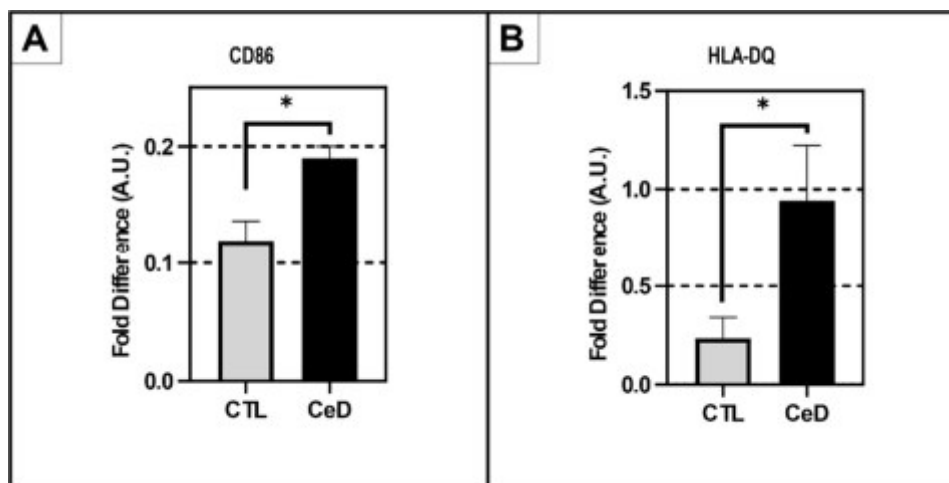
dendritické buňky, což je spojeno zejména s vyšší expresí HLA II. třídy a kostimulačních receptorů (např.: CD86). Mikroskopicky je tato změna pozorována jako zvětšení objemu a zkrácení tenkých výběžků cytoplasmatické membrány. In vitro je tohoto stavu možné docílit stimulací pomocí LPS, v případně této studie pomocí PTG. Úspěšná diferenciací moDC byla potvrzena pomocí kontrolního měření a srovnání exprese povrchových molekul u monocytů před kultivací a u moDC po kultivaci. moDC u všech skupin (CTL, CeD, ATH) vykazovaly statisticky významné zvýšení exprese povrchových znaků CD11c ( $p = 0,00055$ ), CD86 ( $p = 0,00024$ ), HLA-DQ ( $p = 0,00133$ ) a statisticky významné snížení exprese povrchového znaku CD14 ( $p = 0,00001$ ; graf 1).



**Obrázek č. 7, Analýza exprese CD86 na povrchu dendritických buněk po stimulaci. LPS (oranžová křivka) / PTG (černá křivka). Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ .**

Znaky CD14, CD11c, CD86 a HLA-DQ byly využity i pro funkční analýzu dendritických buněk a jejich schopnosti reagovat na různé antigeny ve svém prostředí. Na základě kontrolních měření (viz výše) byl stanoven fenotyp nezralých dendritických buněk jako CD14-CD11c+. Po 24 h stimulaci LPS / PTG došlo k indukci zrání. Zralé dendritické buňky vykazovaly fenotyp CD14-CD11c+CD86+HLA-DQ+ (Mbongue, Nieves, Torrez, & Langridge, 2017). moDC kultivované v 24 jamkových kultivačních destičkách byly zvlášť stimulovány pomocí LPS a zvlášť pomocí PTG. Výsledky byly měřeny na průtokovém cytometru. Úroveň stimulace pomocí LPS představuje pozitivní kontrolu, ke které byly vztahovány hodnoty exprese CD86 a HLA-DQ po stimulaci PTG (graf 2). moDC zdravých kontrol stimulované PTG vykazovaly statisticky významně nižší expresi CD86 ve srovnání se stimulací pomocí LPS (obr. 7B, D). Podobná situace byla pozorována při expresi HLA-DQ, kde úroveň exprese byla opět statisticky významně nižší ( $p = 0,046$ ;

obr. 6B, D). moDC od CeD pacientů stimulované PTG nevykazovaly statisticky významný rozdíl v expresi HLA-DQ ( $p = 0,625$ ; obr. 6A, C) ani CD86 ( $p = 0,0476$ ;



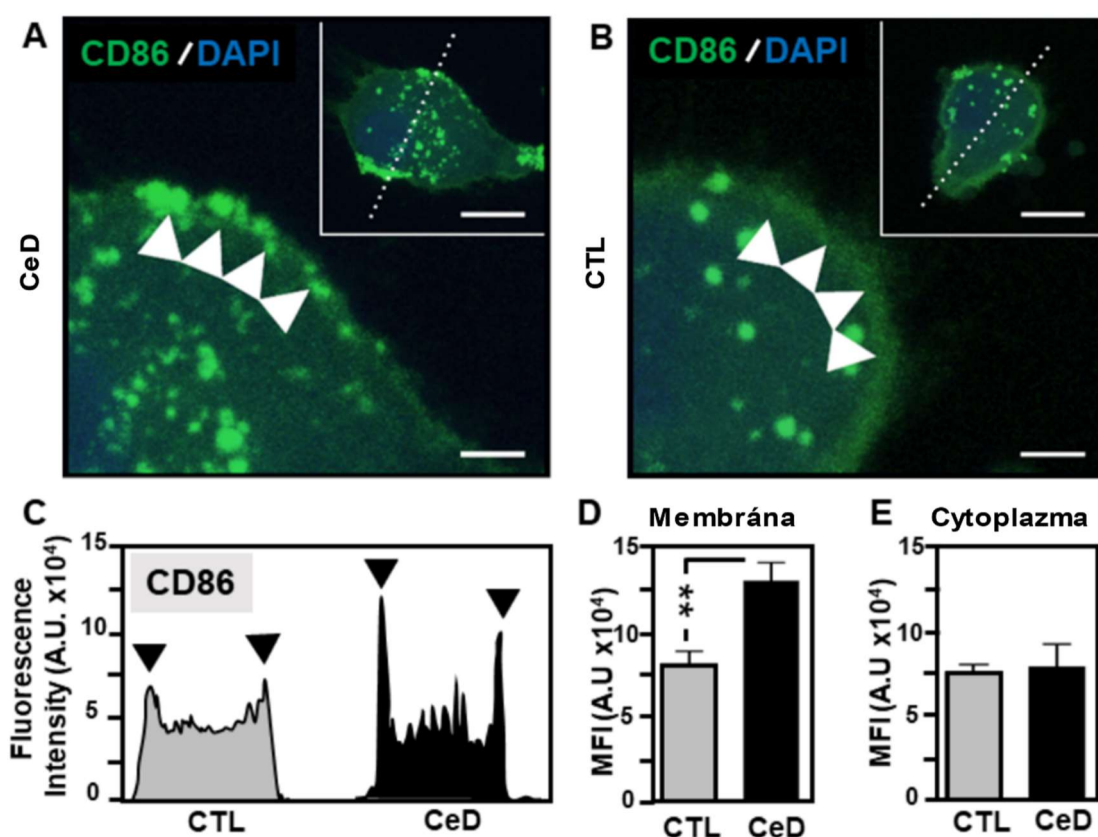
**Graf č. 2, Statistické zhodnocení stimulace dendritických buněk.** Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ .

obr. 7A, C) ve srovnání se stimulací pomocí LPS. Data byla následně normalizována podle exprese po stimulaci LPS u moDC obou skupin (CeD a CTL) a obou znaků (CD86 a HLA-DQ). Exprese CD86 po stimulaci PTG byla statisticky významně vyšší ( $p = 0,0476$ ; graf 2) u moDC od CeD pacientů oproti CTL. Podobně byla exprese HLA-DQ po stimulaci PTG statisticky významně vyšší ( $p = 0,0179$ ; graf 2) u moDC od CeD pacientů oproti CTL. Úroveň exprese CD86 u moDC od CeD pacientů byla 1,7 násobkem hodnoty naměřené u CTL a v případě HLA-DQ se jednalo o rozdíl 2,2 násobku hodnot CTL. Zvýšená exprese CD86 a HLA-DQ u CD14-CD11c+ moDC vůči expozici PTG zdůrazňuje přecitlivělost CeD pacientů na tento stimulant na rozdíl od obecné homeostatické odpovědi.

### 7.5. Zvýšená distribuce CD86 na povrchu moDC u CeD pacientů oproti CTL

Analýza na průtokovém cytometru ukázala schopnost výraznější reakce na PTG u moDC od CeD pacientů, která se mimo jiné projevila vyšší expresí kostimulační molekuly CD86. Je známo, že přítomnost dostatečného množství kostimulačních molekul při prezentaci antigenu pomocí HLA II. třídy je potřeba k plné aktivaci T lymfocytu. Z toho důvodu byla analyzována distribuce CD86 u zralých moDC pomocí konfokální mikro-

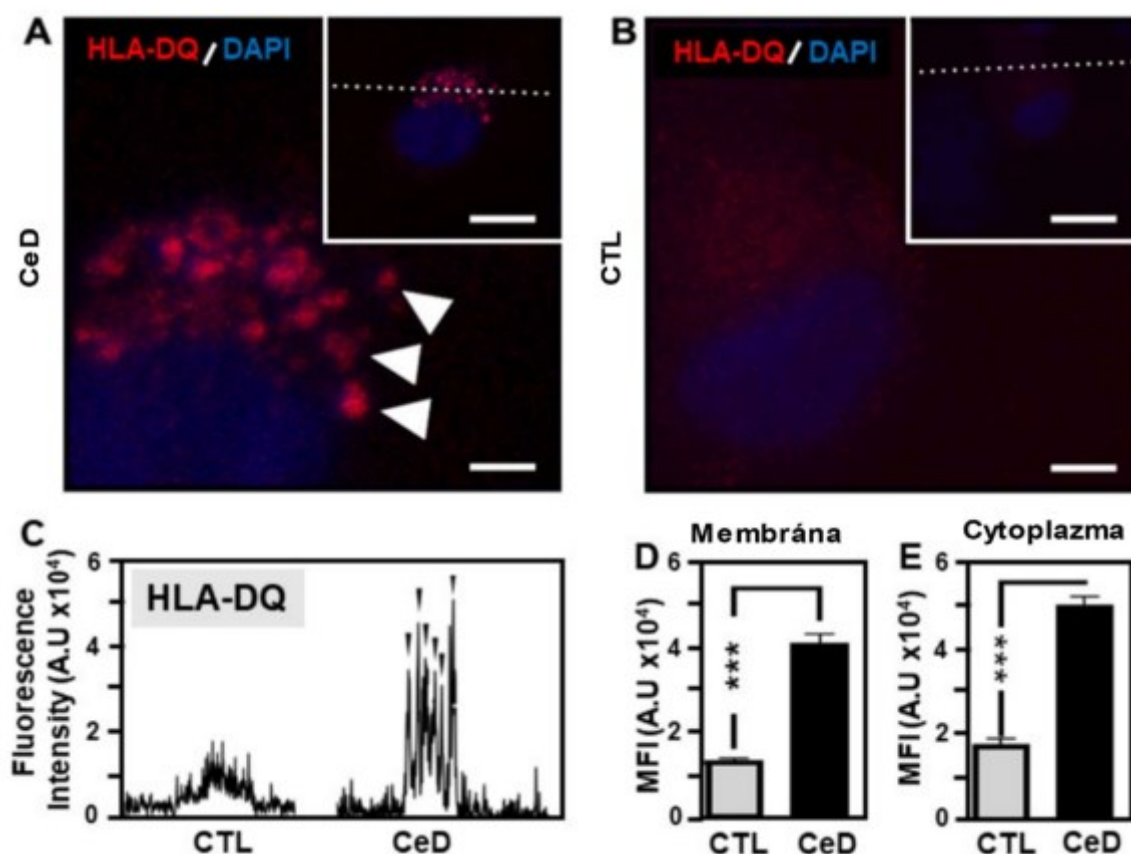
skopie. Z obrázku 8 je patrné, že CD86 je rozdílně distribuován v cytoplasmě a cytoplazmatické membráně při porovnání CTL a CeD dendritických buněk (obr. 8A a 8B). Analýza ukázala statisticky významný rozdíl v úrovni exprese CD86 u moDC od pacientů s CeD oproti CTL (1,6 násobné zvýšení,  $p = 0,0037$ ; obr. 8C a 8D) na cytoplazmatické membráně. Úroveň signálu pocházejícího z cytoplasmy moDC od pacientů s CeD a CTL se statisticky významně neliší ( $p = 0,381$ ; obr. 8E). To podporuje předchozí zjištění u diabetických pacientů, které ukazuje, že zralé moDC navyšují syntézu kostimulačních receptorů, jako je CD86, během prezentace antigenu (Mbongue et al., 2017). Zároveň je patrné, že dochází k transportu těchto molekul na cytoplazmatickou membránu, kde je možné pozorovat významné nahromadění signálu.



**Obrázek č. 8, Analýza exprese CD86 na dendritických buňkách pomocí konfokálního mikroskopu.** (A, B) Bílé šipky označují oblast cytoplazmatické membrány. Přerušovaná čára ilustruje profil intenzity fluorescence. (C) Analýza profilu intenzity fluorescence. (D, E) Statistické vyhodnocení analýzy. Měřítka detailu 10  $\mu\text{m}$ , měřítka fotografie celé buňky 5  $\mu\text{m}$ . Znak \*\* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,005$ .

## 7.6. Zvýšená distribuce HLA-DQ na povrchu moDC u CeD pacientů oproti CTL

Podobně jako CD86, byla pozorována zvýšená exprese HLA-DQ v odpovědi na stimulaci PTG u moDC od CeD pacientů na průtokovém cytometru. Další výsledky získané analýzou distribuce molekul HLA-DQ u zralých moDC na konfokálním mikroskopu byly v souladu s předchozím měřením (obr. 9A a 9B), ale lišily se od analýzy distribuce CD86. V případě HLA-DQ byl pozorován statisticky významný rozdíl v expresi HLA-DQ nejen na cytoplasmatické membráně ( $p = 0,00028$ ; obr. 9C a 9D), ale i statisticky významné zvýšení signálu z cytoplazmy ( $p = 0,0001$ ; obr. 9C a 9E) u moDC od CeD pacientů ve srovnání s CTL. Toto zjištění je v souladu se známou funkcí molekul HLA-DQ (28), které rozpoznávají a prezentují antigenní peptidy CD4<sup>+</sup> T pomocným lymfocytům a tím umožňují aktivaci vrozeného imunitního systému. Zvýšení cytoplasmatického signálu koresponduje s vysokou intenzitou zpracování antigenního peptidu a jeho vazby



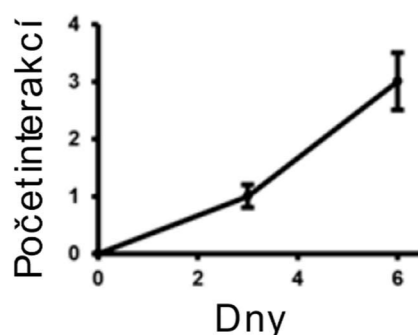
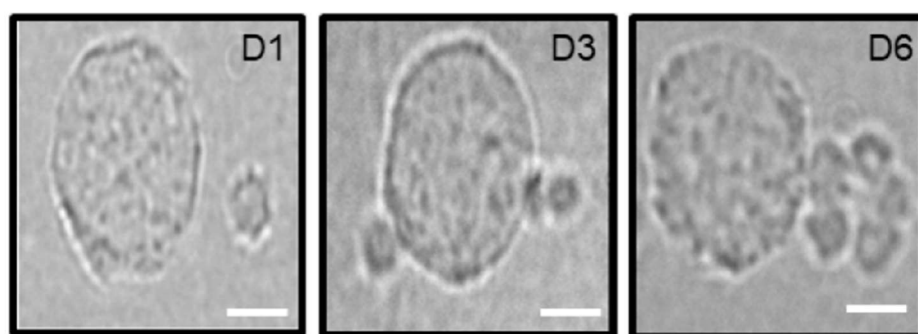
**Obrázek č. 9, Analýza exprese HLA-DQ na dendritických buňkách pomocí konfokálního mikroskopu.** (A, B) Bílé šipky označují oblast detekce signálu. Přerušovaná čára ilustruje profil intenzity fluorescence. (C) Analýza profilu intenzity fluorescence. (D, E) Statistické vyhodnocení analýzy. Měřítka detailu 10  $\mu\text{m}$ , měřítko fotografie celé buňky 5  $\mu\text{m}$ . Znak \*\*\* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,0005$ .

s HLA II. třídy v MIIC váčcích před tím, než dojde k prezentaci komplexu HLA-DQ-antigenní peptid na cytoplazmatické membráně. Na rozdíl od kontrolních moDC, signál detekovaný u moDC od CeD pacientů je koncentrován do velkých shluků.

#### 7.7. Kultivační medium obsahující exozomy produkované zralými dendritickými buňkami je schopno aktivovat T lymfocyty bez nutnosti mezibuněčné interakce

Předchozí analýzy potvrdily schopnost monocytů se diferencovat v in vitro podmínkách do nezralých dendritických buněk (Hudec et al., 2021). Kultivace v přítomnosti LPS nebo PTG ukázala odlišnou reakci dendritických buněk izolovaných z plné krve CeD pacientů a následnou indukci transformace zralých dendritických buněk. Tato transformace byla doprovázena změnou fenotypového profilu a změnou distribuce molekul účastnících se prezentace antigenu (CD86, HLA II. třídy). Pro potvrzení funkční aktivace T lymfocytů

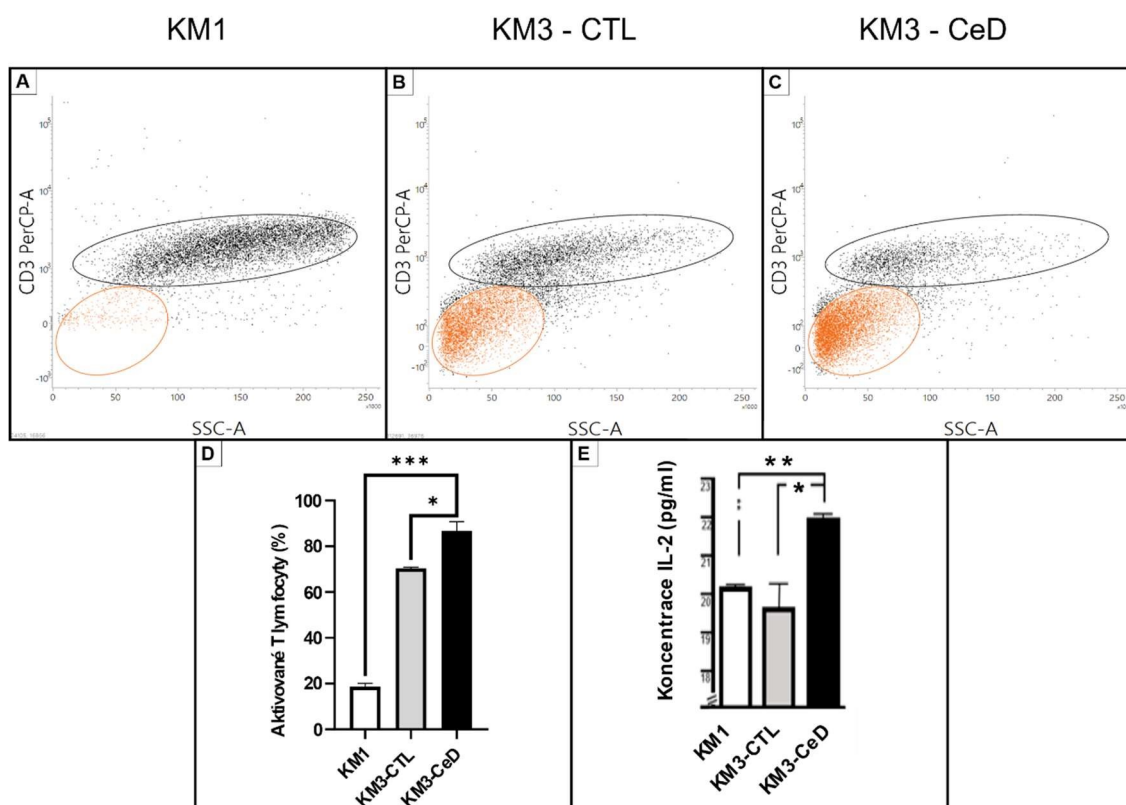
#### Kokultivace T lymfocytů : moDC



**Obrázek č. 10, Analýza kokultivace T lymfocytů s moDC. Měřítka 5  $\mu$ m.**

zralými dendritickými buňkami byla provedena kokultivace dvou buněčných typů: zralých dendritických buněk a naivních T lymfocytů. Kultivované buňky byly analyzovány a hodnoceny 1., 3. a 6. den kokultivace (obr. 10), kdy byl hodnocen počet interagujících dendritických buněk a T lymfocytů. První den kokultivace byl zaznamenán minimální počet interakcí. Mezi třetím a šestým dnem byl zaznamenán dvojnásobný nárůst interakcí DC-T lymfocyt ( $1 \pm 0,1$  a  $3 \pm 0,5$  interakcí). Tímto způsobem byla potvrzena interakce dendritických buněk s T lymfocyty a též kontakt HLA II. třídy s TCR.

S ohledem na nejnovější poznatky v literatuře, byl testován aktivační potenciál bezbuněčného kultivačního media 3, v kterém došlo k diferenciaci monocytů na dendritické buňky a následné indukci zrání dendritických buněk. Stanovili jsme hypotézu, že KM3 obsahuje exozomy vyprodukované zralými dendritickými buňkami. Byly určeny 4 testovací skupiny: 1) T lymfocyty kultivované v čerstvém KM1 bez přidání LPS, 2) T lymfocyty kultivované v čerstvém KM1 s přidáním LPS, 3) T lymfocyty kultivované v KM3-CTL, izolovaném po kultivaci dendritických buněk zdravých dárců, 4) T lymfocyty



**Obrázek č. 11, Analýza aktivity T lymfocytů po kultivaci v KM3.** Černá populace CD3<sup>+</sup>, oranžová populace CD3<sup>-</sup>. Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ .

kultivované v KM3-CeD, izolovaném po kultivaci dendritických buněk CeD pacientů. Šestý den kultivace došlo k rozdělení T lymfocytů na dvě populace: CD3<sup>+</sup> a CD3<sup>-</sup> (obr. 11).

T lymfocyty patřící do skupiny 1 (KM1-LPS) vykazovaly minimální pokles exprese CD3 i minimální diferenciaci T lymfocytů na dvě populace ( $24 \pm 2$  %). Významný statistický rozdíl v poklesu exprese CD3 i v diferenciaci na dvě populace vykazovaly T lymfocyty kultivované jak v KM3-CTL ( $74 \pm 2$  %,  $p = 0,05$ ; obr. 11B, D), tak i v KM3-CeD ( $90 \pm 1$  %,  $p = 0,0003$ ; obr. 11C, D). Je třeba poznamenat, že kompetitivní vazba mezi HLA-DQ a anti-CD3 mohla ovlivnit výsledek ukazující převahu populace T lymfocytů se sníženou expresí CD3.

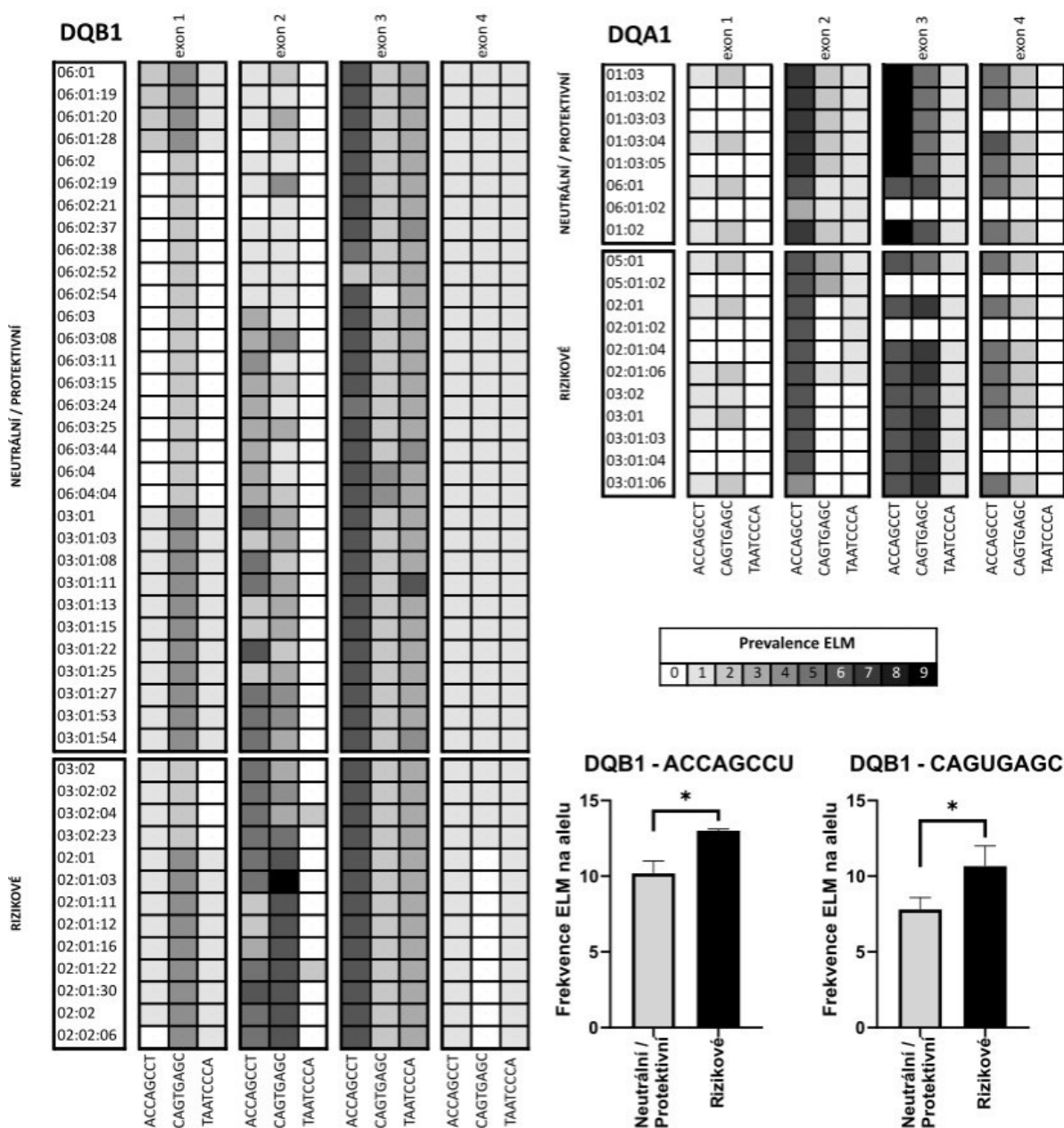
Aktivace T lymfocytů z testovacích skupin 2, 3 a 4 byla následně potvrzena analýzou produkce IL-2 (pg/ml) pomocí metody ELISA. Statisticky významné zvýšení produkce mezi skupinami 2 vs. 4 ( $p = 0,004$ ; obr. 11E) a 3 vs. 4 ( $p = 0,05$ ; obr. 11E) bylo pozorováno a korelovalo s výsledky z předchozí analýzy exprese CD3 na průtokovém cytometru.

Tyto výsledky naznačují, že přímý kontakt T lymfocytů s DC nemusí být jedinou cestou buněčné komunikace při regulaci imunitní reakce. Alternativní cestou může být komunikace skrze extracelulární váčky, exozomy. Kromě toho KM3-CeD izolované od dendritických buněk CeD pacientů vykazovalo zvýšenou kapacitu pro aktivaci T lymfocytů a sekreci cytokinů.

#### **7.8. Alely genů HLA-DQA1 a HLA-DQB1 asociované se zvýšeným rizikem rozvoje CeD obsahují vyšší frekvenci sekvencí lokalizující pro extracelulární transport**

V posledních letech bylo zjištěno, že extracelulární váčky produkované dendritickými buňkami zahrnují i exozomy (Gurunathan, Kang, Jeyaraj, Qasim, & Kim, 2019) a bylo prokázáno, že nesou funkčně aktivní molekuly HLA I. a II. třídy v komplexu s antigenními peptidy (Munich, Sobo-Vujanovic, Buchser, Beer-Stolz, & Vujanovic, 2012). Geny HLA-DQA1 a HLA-DQB1 jsou lokalizovány na chromozomu 6p21.32 a jejich transkripce probíhá v opačném směru. Oba geny obsahují až pět exonů. Gen HLA-DQA1 je delší než gen HLA-DQB1 o 10 250 bp. Kromě přítomnosti molekul HLA na povrchu bylo zjištěno, že exozomy mohou nést náklad i uvnitř váčku, např. proteiny a různé nukleové kyseliny. Důležité je, že pro transport nukleových kyselin, zejména různých typů

RNA (Batagov et al., 2011; O'Leary et al., 2015), byly objeveny speciální lokalizační motivy pro cílení transportu těchto molekul do exozomů a pro extracelulární transport (ELM). ELM jsou známy celkem tři: 1) ACCAGCCU, 2) CAGUGAGC, 3) UAAUCCCA (Batagov et al., 2011; O'Leary et al., 2015). Za účelem objasnění přítomnosti ELM v genech pro HLA-DQ byly po-užity sekvence alel z databáze IPD-MHC. Jednotlivé alely byly rozděleny do dvou skupin na: rizikové pro rozvoj CeD a alely s neutrálním /



Obrázek č. 12, Analýza ELM na vybraných alelách genů HLA-DQA1 a HLA-DQB1.

Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ .

protektivním efektem (Maccari et al., 2020). V exonech těchto alel byla hodnocena přítomnost a frekvence ELM o plné délce nebo o délce nejméně 5 bp dlouhých fragmentů.

Co se týče genu HLA-DQA1, byla zde doložena přítomnost jednoho celého 8 bp dlouhého motivu ACCAGCCU v exonu 3, kódujícího extracelulární doménu, u alel HLA-DQA1\*01:02 a HLA-DQA1\*01:03 (Obr. 12). V rámci této oblasti pro zmíněné, ale i další alely HLA-DQA1 byly nalezeny kratší 5bp dlouhé verze a to s vyšší frekvencí (obr. 12). Tyto ELM vykazovaly vysokou frekvenci i v exonu 4 kódujícího transmembránovou cytoplazmatickou koncovou doménu.

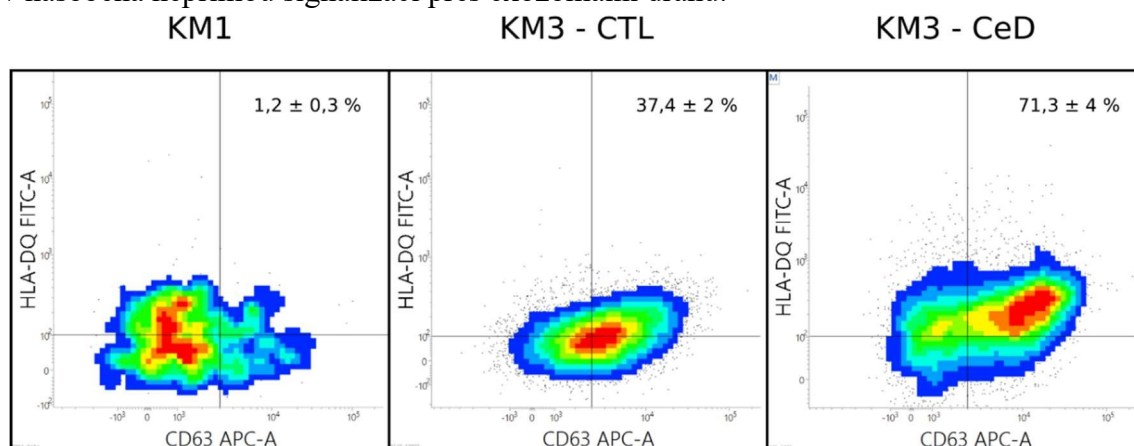
Co se týče genu HLA-DQB1, distribuce ELM byla odlišná. Vedoucí sekvence tohoto genu vykazovala vyšší frekvenci zkrácených motivů CAGUGAGC ve srovnání s genem HLA-DQA1. Bylo zjištěno, že zkrácené motivy ACCAG, ACCAGC, ACCAGCC jsou statisticky významně častější ( $p = 0,03$ ) u alel HLA-DQB1 spojených s rizikem CeD. Podobně u těchto predispozičních alel byly další zkrácené motivy CAGUG, CAGUGA, CAGUGAG statisticky významně častější ( $p = 0,02$ ). Obdobné rozdíly nebyly nalezeny u genu HLA-DQA1 (obr. 12).

Toto je pravděpodobně první zaznamenaný důkaz identifikaci ELM v rámci specifických alel HLA-DQA1 a HLA-DQB1 u adaptivní imunity. Tato analýza navíc prokazuje statisticky významně vyšší frekvenci ELM u alel HLA-DQB1 spojených s vyšším rizikem rozvoje CeD.

### **7.9. T lymfocyty vykazují zvýšenou pozitivitu HLA-DQ na cytoplazmatické membráně po kultivaci v kultivačním mediu obsahující exozomy produkované zralými dendritickými buňkami**

Tedy prokázali jsme, že funkční zralé dendritické buňky diferencované in vitro jsou schopné interagovat s T lymfocyty a že geny HLA-DQ obsahují ELM předurčující část transkribované RNA k transportu do exozomů. Následně jsme ukázali, že kultivační medium KM3 s odstraněnou buněčnou frakcí je schopno navodit změny u kultivovaných T lymfocytů. Z tohoto důvodu byla provedena detailnější analýza výsledku kultivace T lymfocytů v KM3. Z předchozích poznatků bylo předpokládáno, že KM3 obsahuje exozomy vyprodukované zralými dendritickými buňkami. Tyto exozomy by měly nést na svém povrchu typický exozomální znak CD63 a molekuly HLA II. třídy (HLA-DQ) určené k prezentaci antigenních peptidů. Navíc tyto exozomy mohou nést uvnitř náklad v podobě antigenů, proteinů či nukleových kyselin RNA / DNA obsahujících ELM.

Z výše uvedeného vyplývá, že kultivované T lymfocyty, které v přítomnosti KM3 mění expresní profil CD3+/-, by mohly být ovlivněny exozomy. Výsledky z průtokové cytometrie, kde byly detailněji analyzovány expresní profily T lymfocytů kultivovaných v KM3, ukazují statisticky významné zvýšení signálu pro přítomnost CD63 a HLA-DQ. Oproti tomu T lymfocyty kultivované v čerstvém KM1 vykazovaly minimální pozitivitu na přítomnost CD63 či HLA-DQ ( $1,2 \pm 0,3\%$  dvojité pozitivních buněk; obr. 13). T lymfocyty kultivované v KM3-CTL (izolované po diferenciaci zralých dendritických buněk zdravých dárců) vykazovaly zvýšenou pozitivitu na přítomnost CD63 a HLA-DQ ( $37,4 \pm 2\%$  dvojité pozitivních buněk; obr. 13). Ovšem navíc T lymfocyty kultivované v KM3-CeD (izolované po diferenciaci zralých dendritických buněk CeD pacientů) vykazovaly statisticky významně zvýšenou pozitivitu na přítomnost CD63 a HLA-DQ (1,9 násobné zvýšení,  $71,3 \pm 4\%$  dvojité pozitivních buněk; obr. 13). Nárůst dvojité pozitivních buněk poukazuje na pravděpodobnost přímého ovlivnění T lymfocytů exozomy. Rozdíl mezi KM3-CTL a KM3-CeD může být dán mimo jiné odlišnou schopností molekul HLA II. třídy vázat a stimulovat T lymfocytární reakci skrze vazbu na TCR (Kovacs et al., 2020). Tyto výsledky poskytují důkaz, že konvenční stimulace T lymfocytů zralými dendritickými buňkami přes přímý kontakt HLA-DQ-antigenní peptid-TCR může být podpořena / násobena nepřímou signalizací přes exozomální dráhu.



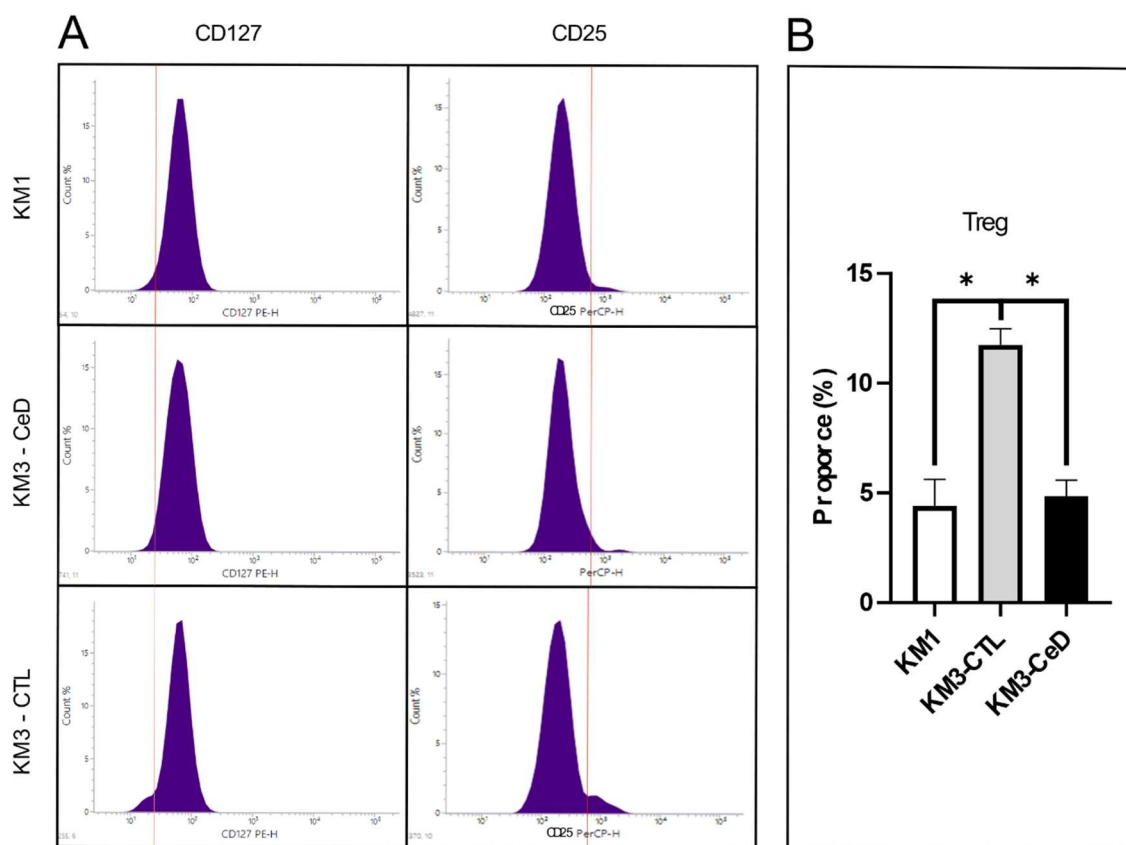
**Obrázek č. 13, Analýza kultivace T lymfocytů s exozomy.**

#### **7.10. Snížená schopnost indukce T regulačních lymfocytů po expozici kultivačního media obsahujícího exozomy produkované zralými dendritickými buňkami**

T regulační lymfocyty indukované na periférii z naivních T lymfocytů (iTreg) napomáhají potlačení imunitních odpovědí, umožňují udržovat homeostázu a toleranci

(Kondělková et al., 2010). Snížená hladina Treg populace proto může vést k rozvoji autoimunitního onemocnění (Guo & Zhou, 2015). Bylo publikováno, že in vitro indukované Treg mohou potlačit autoimunitní stavy in vivo (Zheng, Gray, Ohtsuka, Yamagiwa, & Horwitz, 2002).

Vzhledem k rozdílnému stavu aktivace T lymfocytů, po expozici KM3-CeD ve srovnání s KM3-CTL (viz podkapitola 7.7.), jsme se následně snažili určit potenciální přítomnost Treg po kultivaci T lymfocytů v KM3. Treg se rozliší při analýze na průtokovém cytometru pomocí expresního profilu CD25 a CD127 (Takahashi et al., 2000), (obr. 14). Limitem této analýzy je nekompletní překryv s analýzou pomocí expresního profilu CD25 a Foxp3. Ve způsobu přesného určení Treg populace se uplatňují různé postupy. Další limit této analýzy představuje velmi malé množství Treg, které lze analyzovat.



**Obrázek č. 14, Analýza indukce T regulačních lymfocytů.** (A) Červená linie vymezuje úroveň signálu odlišující fenotypový profil Treg CD25+CD127-. (B) Znak \* odpovídá statisticky významnému rozdílu  $p < 0,05$ .

Treg lze odlišit pomocí expresního profilu CD4+CD25+CD127-. Tyto znaky byly analyzovány u T lymfocytů kultivovaných v KM3-CTL a KM3-CeD. Jak je patrné z obrázku 14, buňky mající expresní profil CD25+CD127- představují velmi malé množství. Treg představují malé navýšení signálu na úpatí vrcholu histogramu (CD25+ i CD127+; obr. 14A). Porovnání histogramových grafů u ukázalo statisticky významný rozdíl mezi populacemi T lymfocytů vystavenými KM3-CTL ve srovnání s populacemi T lymfocytů vystavenými KM3-CeD (obr. 4A, B). Statisticky významný rozdíl v proporcích indukovaných Treg nebyly pozorovány mezi T lymfocyty kultivovanými v KM1 a KM3-CeD. Významný nárůst populace Treg byl pozorován zejména u T lymfocytů kultivovaných v KM3-CTL. Statisticky významný rozdíl vykazuje porovnání výsledku kultivace mezi KM3-CeD a KM-CTL ( $p = 0,01$ ; obr. 14B), stejně tak KM1 a KM3-CTL ( $p = 0,02$ ; obr. 14B).

Navzdory omezení malou velikostí vzorku, měření stále určila subpopulaci Treg v populaci T lymfocytů kultivovaných v KM3-CTL. Důležité je, že nepřítomnost znaků Treg v populaci T lymfocytů vystavených KM3-CeD možná svědčí o snížené indukcii Treg nebo snížené expresi Treg znaků v důsledku inhibičních sekrečních faktorů produkováných dendritickými buňkami CeD pacientů. Nižší hladina Treg nebo její absence predisponuje CeD pacienty k rozvoji autoimunitních nebo alergických chorob.

Poslední část disertační práce tedy ukázala, že dendritické buňky a exozomy spolu s cytokinovým prostředím jsou schopny indukce Treg v případě buněk izolovaných od zdravých dárců. Tato schopnost je však snížena u buněk izolovaných od CeD pacientů.

## 8. DISKUZE METODICKÝCH POSTUPŮ A VÝSLEDKŮ, VČETNĚ SROVNÁNÍ S LITERATUROU

Cílem této dizertační práce bylo objasnit úlohu funkce a exprese molekul HLA II. třídy na dendritických buňkách vzhledem ke vzniku autoimunitní reakce u celiakie (CeD). Kromě toho byl popsán expresní profil povrchových molekul monocytů. Rovněž byly analyzovány dendritické buňky diferencované z monocytů a jejich exprese HLA-DQ spolu s kostimulačními povrchovými receptory.

Velice důležité je si uvědomit, že pro výzkum regulace exprese molekul HLA II. třídy, je nejprve nutné si stanovit adekvátní buněčný typ pro analýzu. Je známo, že HLA II. třídy jsou exprimovány buňkami prezentujícími antigen (APC). Ale tento fenotyp je společný pro mnoho buněčných typů s rozdílným původem a funkcí. HLA II. třídy jsou exprimovány B lymfocyty vznikající z lymfoidního prekursoru, makrofágy diferencující se z neutrofilů, makrofágy diferencující se z monocytů a dendritickými buňkami produkovánými společným myeloidním prekurzorem. Každý tento buněčný typ má svou úlohu při vzniku imunitní reakce, jak u zánětu, tak i při udržování homeostázy. V případě vzniku autoimunitní poruchy představuje každý z těchto buněčných typů určitou míru selhání při poruše tolerance autoantigenů. Dodnes neexistuje shoda v jasné příčině a původu vzniku autoimunit. Existují faktory, které mají protektivní úlohu, či naopak riziko rozvoje těchto chorob zvyšují. Z komplexnosti a názvu, multifaktoriální choroby, vyplývá, že se pravděpodobně jedná o kaskádovité selhání různých kontrolních bodů imunitního systému zahrnující i genetické faktory. HLA geny představují jednu z nejvýznamnějších dosud známých predispozic k rozvoji autoimunitní reakce (Taneja & David, 1999). Pro přesnou analýzu regulace transkripce HLA genů a jejich post-translačních úprav je nutné si stanovit jasnou hypotézu, cíle a předmět výzkumu. Většina buněk organismu HLA geny II. třídy neexprimuje. K zahájení prezentace antigenu na různých APC je zapotřebí různého cytokinového prostředí. Pokud nedojde k interakci buněk ve správném stadiu diferenciace a ve správném pořadí, dochází k navození anergie či přímo apoptózy efektorových buněk. Tato práce se zaměřuje na studium dendritických buněk diferencovaných z monocytů jako na model pro studium exprese HLA II. třídy v kontextu CeD.

V roce 1973 byly poprvé popsány buňky s fenotypem dnes známých dendritických buněk (Steinman & Cohn, 1973). Funkcí a popisem těchto buněk dnes nejvíce odpovídají konvenční dendritické buňky, tedy buňky schopné rozpoznat antigen, což vede k indukci jejich zrání. Zralá dendritická buňka poté migruje do sekundární lymfatické uzliny, kde

je schopna aktivovat T lymfocyty a spustit tak adaptivní imunitní odpověď. Od té doby bylo spektrum dendritických buněk rozšířeno mimo jiné o plazmacytoidní dendritické buňky nebo dendritické buňky diferencované z monocytů. Bylo popsáno i mnoho nových typů pomocných (helper) T lymfocytů, mimo jiné: Th1, Th2, Th17, Th22, Treg, nebo Th17. Klasifikace imunitních buněk je dnes mnohem složitější a koncept aktivace adaptivní imunitní odpovědi skrze stimulaci T lymfocytu dendritickou buňkou vyžaduje revizi (Cabeza-Cabrero, Cardoso, Minutti, Pereira Da Costa, & Reis E Sousa, 2021).

Stěžejní publikace o CeD ukázala výsledky analýzy buněk biopsie tenkého střeva (Ráki et al., 2006). Nejpočetnější skupinou buněk nalezených ve střevní vrstvě *lamina propria* a prezentujících antigen jsou makrofágy a CD11c+ dendritické buňky, přičemž HLA-DQ2+ buňky byly tvořeny z 80 % CD68+ buňkami (liniový znak makrofágů) a z 20 % CD11c+ buňkami (znak myeloidních/konvenčních dendritických buněk). Nebyla zde nalezena populace CD68+CD11c+ buněk. HLA-DQ+CD68+ buňky exprimovaly další znaky: RFD7 a CD32. Oba tyto znaky jsou opět typické pro makrofágy. Tuto domněnku potvrdil i morfologický nálezn, nebo buňky byly velké s polygonálním tvarem. Oproti tomu HLA-DQ+CD11c+ buňky byly menší s mnoha cytoplazmatickými výběžky, které jsou typické pro dendritické buňky (Ráki et al., 2006).

Další důležité poznání přináší výzkum původu dendritických buněk nacházejících se v *lamina propria*. Jejich CD11c pozitivita vylučuje jeden z možných prekurzorů cirkulujících v krvi, plazmacytoidní dendritické buňky, které jsou negativní na CD11c. Monocyty a klasické myeloidní dendritické buňky jsou CD11c+. Myeloidní dendritické buňky jsou tvořeny dvěma populacemi buněk, které lze rozlišit pomocí exprese CD1c nebo BDCA3. Výsledky ukázaly, že CD11c+ buňky byly negativní na BDCA3. Avšak většina (70 %) CD11c+ buněk byla negativní i pro CD1c. Ani exprese monocytárního znaku CD14 nebyla potvrzena na CD11c+ buňkách v *lamina propria*. Zajímavý poznatek přineslo měření exprese CD14 podle vrstev ve střevní mukóze. V hlubších vrstvách totiž byly nalezeny buňky exprimující CD14 a tato pozitivita klesala ve směru k epiteliální vrstvě. Srovnání biopsií tenkého střeva zdravých dárců a neléčených CeD pacientů přineslo vysvětlení o možném původu nalezených dendritických buněk. U biopsií od CeD pacientů byl prokázán nárůst HLA-DQ2+CD68+ makrofágů o 25 % a HLA-DQ2+CD11c+CD1c- dendritických buněk o 300 %. V hlubších vrstvách *lamina propria*, kde dochází k vstupu nových leukocytů do tkáně, byl popsán nárůst CD14+ buněk o 300–400 %. Byl zde objeven i přechodný typ monocytů s fenotypem CD14+CD11c+. Je tedy pravděpodobné, že hlavním typem APC v *lamina propria* CeD pacientů jsou dendritické

buňky diferencované z monocytů. Alternativní vysvětlení by znamenalo, že myeloidní dendritické buňky ztrácí expresi CD1c při vstupu do tkáně, což je však nepravděpodobné, protože v jiných tkáních se zdá exprese CD1c na myeloidních dendritických buňkách velmi stabilní.

Důležitý posun v chápání úlohy APC, které představují tkáňově specifické makrofágy, přináší Ginhoux a Williams (Ginhoux & Williams, 2016). Aktuální výsledky poskytují nový pohled na původ tkáňově specifických makrofágů. Podle nejnovější teorie většina těchto buněk má původ z prekursorů z embryonálního žloutkového váčku či později z fetálních jater. V tomto prenatálním období dochází k obsazení tkání prekursorů makrofágů, které jsou schopny svou populaci udržovat bez potřeby doplnění dalšími makrofágy diferencovanými z monocytů. Z monocytů diferencované makrofágy a dendritické buňky mohou mít významný vliv v případě zánětu, kdy je potřeba danou tkáň posílit při obranné imunitní reakci. Tento koncept vrozené imunitní odpovědi přináší nové otázky k tématu o dysregulaci imunitního systému v případě chronického zánětu.

Česká republika se řadí mezi země s vyšší prevalencí CeD, proto výzkum této choroby je v popředí zájmu odborné i laické veřejnosti. Pro účely této disertační práce byly vybrány tři rodiny s anamnézou autoimunitních onemocnění a výskytem celiakie v poslední generaci. Monocyty byly selektovány na základě exprese povrchových molekul CD14 a CD16. Analýza pomocí průtokové cytometrie ukázala vyšší hladinu monocytů u CeD pacientů ve srovnání se zdravými dárči. Další analýza identifikovala nový fenotypový profil charakterizovaný zvýšenou expresí CD64 a sníženou expresí CD33, jedinečný pro CD14<sup>++</sup> monocyty CeD pacientů. Monocyty CeD pacientů se efektivněji diferencovaly po stimulaci pomocí cytokinů a antigenů LPS / PTG do zralých dendritických buněk. Zavedený *in vitro* model diferenciací a zrání dendritických buněk byl ověřen na průtokové cytometrii, kde buňky vykazovaly fenotyp CD14-CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>HLA-DQ<sup>+</sup>. Dendritické buňky CeD pacientů reagovaly na přítomnost PTG zvýšenou expresí HLA-DQ a CD86 na rozdíl od dendritických buněk zdravých dárců, čímž byla prokázána nepřiměřená reakce imunitního systému. Toto zjištění bylo následně potvrzeno na konfokálním mikroskopu analýzou distribuce molekul HLA-DQ a CD86, kde byl pozorován transport obou typů molekul k cytoplazmatické membráně, na jejímž povrchu HLA-DQ a CD86 vykonávají funkci při prezentaci antigenu a stimulaci T lymfocytů.

Epidemiologická publikace pracující s rozsáhlou populační kohortou stanovila prevalenci CeD v Evropské unii na úrovni 1 % (Mustalahti et al., 2010). Populační studie

ukázaly, že prevalence CeD se v různých evropských zemích značně různí, přičemž nejvyšší prevalenci má Finsko, cca. 2 % (Mustalahti et al., 2010; Vilppula et al., 2008). Nedávné výsledky odhadovaly výskyt CeD v České republice na úrovni 0,3 % (Bai & Ciacci, 2017), avšak existuje publikace českých autorů s predikcí výrazně většího nárůstu (Šumník et al., 2000). Důvod zvýšení výskytu CeD není znám, ale předpokládá se možná spojitost s faktory tzv. „hygienické hypotézy“ (Lebwohl, Ludvigsson, & Green, 2015).

Příbuzní prvního stupně CeD pacientů mají zvláště vysoké riziko vzniku choroby, které se odhaduje na 4–17 % (Biagi et al., 2008; Fasano et al., 2008); a pokud jsou homozygotní pro HLA-DQ2, dosahuje toto riziko rozvoje CeD v raném věku 26 % (Lionetti et al., 2014).

Patogeneze CeD není doposud jasně vysvětlena a nejsou známy ani funkční *in vitro* modely pro její studium (Moerkens, Mooiweer, Withoff, & Wijmenga, 2019). Nedávno byla vyvinuta strategie pro využití mononukleárních buněk periferní krve (PBMC), které obsahují B a T lymfocyty reaktivní na lepek, dendritické buňky a monocyty. Tato metoda nabízí možnou cestu pro studium reakce imunitního systému na více úrovních. Omezená diverzita epitopů představuje výhodu a umožňuje použití peptidových fragmentů vzniklých štěpením pepsinu a trypsinu v *in vitro* modelu CeD. Jiné publikace se zaměřily na charakterizaci T lymfocytů z PBMC pomocí tetramerů pHLA II. třídy (Kurki, Kemppainen, Laurikka, Kaukinen, & Lindfors, 2021). Tato technika identifikovala zvýšenou expresi CD38 na T lymfocytech jako možný fenotypový znak po re-expozici lepku nebo pro diagnózu CeD (du Pre et al., 2011). Metoda využívající tetramery pHLA II. třídy však stále potřebuje další zpracování PBMC, aby byly výsledky dostatečně ověřeny (Kurki et al., 2021).

Disertační práce se zaměřila na buněčné populace účastníci se prezentace antigenu. Nejprve byly izolovány PBMC od CeD pacientů a zdravých dárců. Následně bylo cíleno na CD14<sup>++</sup> monocyty a jejich indukovanou transformaci na dendritické buňky (moDC). Na průtokové cytometrii provedená analýza fenotypových znaků a hodnocení exprese umožnily přesnou selekci monocytů izolovaných z plné krve CeD pacientů a zdravých dárců. Byla jasně prokázána transformace monocytů na moDC po stimulaci LPS / PTG (fenotypový profil CD14-CD11c+CD86+HLA-DQ+).

Důležité je, že se této práci podařilo identifikovat nový buněčný fenotypový profil CeD reprezentovaný expresí povrchových znaků CD33 a CD64 na CD14<sup>++</sup> monocytech. Díky pečlivé analýze výsledků průtokové cytometrie byla snižena exprese CD33 spojena se zvýšenou expresí kostimulačního receptoru CD64. Význam tohoto zjištění vyžaduje

další objasnění vzhledem k tomu, že CD33 představuje molekulu spojenou s funkcí inhibice fagocytózy (Bhattacharjee et al., 2021; Butler et al., 2021) a CD64 je znak časného nástupu manifestace infekce (Ng et al., 2004).

CD33 je receptor, který váže zbytky kyseliny sialové. Jeho hlavní funkční epitopy tvoří dvě imunoglobulinu podobné domény. Jednou z nich je cytoplazmatická doména obsahující imunoreceptorový inhibiční tyrozinový motiv (ITIM, z anglického imunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). Fosforylace tyrozinu na ITIM vede k vazbě a aktivaci homologické Src domény 2 (SH2) obsahující fosfatázu (SHP-1 a SHP-2). Obě tyto fosfatázy slouží k blokaci signálu receptorů s aktivační funkcí. CD33 způsobí inhibici signální dráhy vedené od FcγRI tak, že k aktivačnímu komplexu naváže SHP-1 (Ulyanova, Blasioli, Woodford-Thomas, & Thomas, 1999). Molekula CD33 se vyskytuje nejméně ve dvou izoformách: dlouhá hCD33M a krátká hCD33m. Bylo zjištěno, že běžná dlouhá izoforma snižuje schopnost fagocytózy u mikroglíí a to pravděpodobně díky přímé inhibiční funkci tohoto receptoru, oproti krátké izoformě, kódované alelou rs12459419R, která fagocytózu u mikroglíí zvyšuje (Bhattacharjee et al., 2021). S tímto pozorováním je v souladu i nález, že krátká izoforma má protektivní roli v rozvoji Alzheimerovy choroby. Souvislost mezi Alzheimerovou chorobou a celiakií mohou představovat právě tyto izoformy CD33. Je zajímavé, že ačkoli je CeD z neznámého důvodu asociována s některými neurologickými poruchami, přímé vyšetření pacientů s Alzheimerovou chorobou na základě aktuálních diagnostických postupů nevedlo k průkazu CeD u těchto pacientů (Frisoni et al., 1997; Bodil Roth et al., 2008; Lebwohl et al., 2015a).

Tato disertační práce ukázala, že CD14<sup>+</sup> monocyty CeD pacientů vykazují výrazně nižší expresi CD33 a tudíž mohou mít sníženou schopnost inhibice fagocytózy. Další výzkum v této práci ukázal, že CD33 může být i důležitým regulátorem diferenciaci CD14<sup>+</sup> monocytů na dendritické buňky při stimulaci GM-CSF a IL-4 (Ferlazzo, Spaggiari, Semino, Melioli, & Moretta, 2000). Blokace CD33 vede k přerušení diferenciaci monocytů a buněčné smrti. Takový výsledek přináší možné vysvětlení vyšší indukce diferenciaci CD14<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup> monocytů na dendritické buňky u CeD pacientů.

CD64 (FcγRI) je receptor, který je spojený přes gama řetězec s doménou obsahující imunoreceptorový aktivační tyrozinový motiv (ITAM, z anglického immunoreceptor tyrosine-based activation motif) a po vazbě s ligandem umožňuje aktivaci imunitní buňky. Kromě FcγRI (CD64) jsou na povrchu monocytů exprimovány další třídy Fc receptorů: FcγRII (CD32) a FcγRIII (CD16). Jak již byl zmíněno výše, FcγRI (CD64) je cílen při

stimulaci CD33, která vede k inhibici signálu z FcγRI. CD64 je spojován s indukcí obecně prozánětlivého stavu. V případě autoimunitního systémového lupus erythematosus (SLE) jsou vázány komplexy autoantigenů s autoprotilátkami právě pomocí CD64. Některé výsledky dokonce ukazují, že zvýšená exprese CD64 na cirkulujících monocyttech by se mohla stát pomocným kritériem pro diagnózu raného stadia SLE (Li et al., 2009).

Výsledky disertační práce korelují s aktuálním poznáním funkce CD64. Fenotyp cirkulujících monocytů CD14<sup>+</sup>CD33<sup>dim</sup>CD64<sup>++</sup> CeD pacientů potvrzuje prozánětlivé nastavení díky vyšší expresi CD64 oproti zdravým kontrolám. Naopak oproti zdravým kontrolám snížená exprese CD33 na monocytech CeD pacientů poskytuje vysvětlení pro další výsledky této práce: omezená kontrola inhibice fagocytózy, zvýšená indukce diferenciace dendritických buněk exprimující rizikové alely HLA-DQ, snížená schopnost inhibice signálu od stimulovaného receptoru CD64. Tyto výsledky mohou mít potenciální diagnostickou a terapeutickou aplikaci v klinické praxi.

Nepříměřená reakce moDC na gliadin u CeD, oproti zdravým kontrolám, byla zdokumentována na základě zvýšené exprese CD86 v porovnání s reakcí po stimulaci LPS, což svědčí o významné aktivaci prozánětlivé dráhy (Azeem, Bakke, Appel, Oyan, & Kalland, 2020). Jiní autoři zaznamenali, že CD11c<sup>+</sup> dendritické buňky se akumulují v celiakální lézi a popsali aktivovaný fenotyp dendritických buněk exprimujících receptor CD86 (Ráki et al., 2006), považovaný za jednu z klíčových molekul zapojených do kostimulace T lymfocytů (Choi et al., 2006).

CeD je velmi silně asociována s vybranými alelami HLA II. třídy, dokonce výrazněji než jiná autoimunitní onemocnění, jako je diabetes 1. typu nebo revmatoidní artritida (Thorsby & Lie, 2005). I přes to, že v tomto *in vitro* modelu CeD byla reakce dendritických buněk na přítomnost PTG nižší než na LPS, tato studie ukázala zvýšenou expresi HLA-DQ na moDC pocházejících od CeD pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami, což svědčí o zvýšené citlivosti na přítomnost gliadinu. Nadto analýza výsledků z konfokální mikroskopie poskytla důkazy prokazující převahu CD86 a HLA-DQ na cytoplazmatické membráně moDC izolovaných od CeD pacientů. Robustní exprese CD86 na membráně moDC po expozici peptidu gliadinu poskytuje důkaz o jeho roli v efektivní prezentaci antigenu u CeD. Oproti tomu hladiny HLA-DQ byly výrazně zvýšené jak v cytoplazmě, tak na cytoplazmatické membráně moDC u CeD pacientů na rozdíl od zdravých dárců. Tato data korelují s asociací rizikových HLA-DQ alel s CeD a s jejich vazbou s vybranými antigeny vzniklými štěpením gliadinu.

Výsledky publikované v nedávné práci zaznamenaly konstitutivní expresi CD86 mRNA v prasečích endoteliálních buňkách aorty umožňující rychlou translaci CD86 proteinu a jeho přesun na cytoplazmatickou membránu pravděpodobně z uložené mRNA (Choi et al., 2006). V klidových lidských monocitech byly identifikovány dvě varianty alternativního sestřihu CD86 mRNA charakterizované delecí transmembránové domény (rozpuštná forma CD86) a extracelulární domény (transmembránová forma CD86), (Jeannin et al., 2000). Důsledky přítomnosti rozpuštného CD86 na etiopatogenezi CeD nejsou v současnosti známy.

Konvenční způsob imunologické reakce probíhá přímou interakcí APC s T lymfocyt, konkrétně vazbou komplexu HLA II. třídy - antigenní peptid a TCR (Gaudino & Kumar, 2019). Tato disertační práce potvrdila funkčnost *in vitro* modelu diferenciací monocytů na dendritické buňky, které byly následně kokultivovány s T lymfocyty. Množství přímých buněčných interakcí mezi dendritickými buňkami a T lymfocyty rostlo v čase a vedlo k aktivaci T lymfocytů. Práce navíc ukázala schopnost T lymfocytů se aktivovat i bez přímého buněčného kontaktu pouze vystavením kultivačnímu mediu, získaného po kultivaci zralých dendritických buněk. Byl zaznamenán a statisticky prokázán rozdíl ve stimulační schopnosti kultivačního media, získaného po kultivaci zralých dendritických buněk CeD pacientů (KM3-CeD) a zdravých dárců (KM3-CTL). Dále bylo prokázáno, že nárůst positivity T lymfocytů na molekulu HLA-DQ po kultivaci s KM3-CeD pochází pravděpodobně z exozomálního transportu. Analýza *in silico* alel genů *HLA-DQA1* a *HLA-DQB1* ukázala u rizikových alel zvýšený výskyt sekvenčních motivů lokalizující RNA pro transport do exozomů (ELM). T lymfocyty izolované od zdravých dárců byly schopny stimulace a sekrece IL-2, avšak po vystavení KM3-CeD vykazovaly nižší schopnost indukce a transformace do fenotypu Treg. Tento výsledek poukazuje na možný způsob extracelulární komunikace mezi APC a T lymfocyty při nastavování tolerance proti vybraným antigenům.

Zvýšená exprese kostimulační molekuly CD86 u dendritických buněk izolovaných od pacientů s CeD byla popsána již dříve (Hudec et al., 2021). CD86 a další kostimulační molekuly jsou nezbytné pro úplnou funkční stimulaci T lymfocytů vedle základní vazebné interakce HLA-antigenní peptid-TCR. Důležitým objevem byl důkaz přítomnosti CD86 a HLA I. i II. třídy na exozomech produkovaných dendritickými buňkami. Jsou tedy vhodným objektem k hlubší analýze jejich imunostimulačních kapacit (Zitvogel et al., 1998). Existují názory, že tyto exozomy pocházejí z endocytárních kompartmentů nebo z vnějšího prostředí, a jejich funkcí by mohla být pomoc při tvorbě imunitní synapse

(Turley et al., 2000; Zitvogel et al., 1998). Tato práce prokázala, že KM3-CeD má jiné funkční vlastnosti než KM3-CTL. Rozdíl může představovat právě složení exozomů nenesoucích HLA II. třídy a CD86 (a další kostimulační molekuly). Bezbuňčné medium KM3-CeD, na rozdíl od KM3-CTL, je schopno navodit aktivaci CD3<sup>+</sup> T lymfocytů projevující se změnou exprese povrchových molekul a zvýšením produkce IL-2. Dále bylo potvrzeno, že KM3-CeD nese vyšší podíl HLA-DQ než KM3-CTL.

Aktuální publikace ukazuje, že u CeD pacientů byla naměřena statisticky významně vyšší hladina exozomů produkovaných různými buněčnými typy (endotel, leukocyty, atd.) v porovnání se zdravými kontrolami (Efthymakis et al., 2023). Toto pozorování je ve shodě s výsledky této práce. Aplikace kultivačního media obsahující exozomy produkované zralými dendritickými buňkami vedla ke statisticky významné reakci T lymfocytů. Tyto nálezy lze vysvětlit vyšší koncentrací exozomů obsahujících standardní množství stimulačních molekul (Efthymakis et al., 2023), nebo standardní koncentrací exozomů obsahujících nadstandardně stimulující molekuly. Druhá varianta má oporu ve výsledcích této práce vzhledem k tomu, že i samotné dendritické buňky CeD pacientů vykazují vyšší míru exprese HLA-DQ a CD86 po stimulaci PTG na rozdíl od dendritických buněk zdravých dárců.

Exozomy jako zástupci extracelulárních váčků jsou poslední roky velmi intenzivně studovány pro jejich široké spektrum funkcí v organismu (Anel, Gallego-Lleyda, de Miguel, Naval, & Martínez-Lostao, 2019). Z pohledu této disertační práce je třeba zdůraznit, že se podílejí i na prezentaci antigenů. Je delší dobu známo, že B lymfocyty produkují extracelulární váčky obsahující HLA II. třídy (Raposo et al., 1996). Exozomy umožňují výměnu antigenu mezi různými subpopulacemi dendritických buněk (Fu et al., 2020). Tato práce ukázala, že KM3-CeD, na rozdíl od KM3-CTL, navozuje statisticky významně vyšší schopnost stimulace T lymfocytů a nižší indukci Treg. Funkční nastavení reakce T lymfocytů je důležité pro ustavení tolerance, nebo pro eliminaci patogenu. Výsledky práce naznačují, že exozomální komunikace mezi dendritickými buňkami a T lymfocyty selhává v nastolení tolerance gliadinu, naopak působí prozánětlivě. Podobné výsledky byly ukázány pro autoimunitní systémový lupus erythematosus (SLE), kde exozomy přítomné v krvi SLE pacientů způsobují prozánětlivou stimulaci (Lee, Park, Lee, Lee, & Song, 2016). Obdobně bylo prokázáno, že v případě roztroušené sklerózy exozomy procházejí hematoencefalickou bariérou. Tímto mechanismem se mohou dostávat autoantigeny původem z mozku na periferii (Selmaj, Mycko, Raine, & Selmaj, 2017) a aktivovat imunitní systém.

Další možný mechanismus signalizace u autoimunitní reakce je indukce apoptózy cílových buněk pomocí nekódující RNA (Guay et al., 2019). Tato disertační práce jako první prokázala přítomnost signalizačních sekvencí pro extracelulární transport do exozomů (ELM) v transkriptech genů HLA II. třídy, a to konkrétně vybraných alel HLA-DQA1 a HLA-DQB1. V dlouhé nekódující RNA byly identifikovány nukleotidové cis-působící motivy, které umožňují transport transkriptů pro sbalení do exozomů (Batagov et al., 2011; O’Leary et al., 2015). Analýza *in silico* ve vztahu k CeD odhalila, že se zkrácené ELM (fragmenty  $\geq 5$  bp) nacházejí v protektivních či neutrálních alelách HLA II. třídy, zatímco rizikové alely HLA II. třídy mají významné navýšení frekvence ELM. Ovlivnění ELM v rámci alel HLA genů dává příslib pro budoucí výzkum imunologické funkce exozomů a jejich schopnosti zasahovat do nastavení imunologické tolerance. Dnes však nebyla potvrzena přítomnost RNA nebo DNA genů HLA II. třídy uvnitř exozomů.

Bylo publikováno, že většina exozomů produkovaných dendritickými buňkami a obsahujícími HLA II. třídy nefúzuje s plazmatickou membránou, ani není účinně internalizována do T lymfocytů (Buschow et al., 2009). Exozomy nemusí interagovat s T lymfocyty přes TCR, ale mohou být vázány pomocí leukocytárního funkčního antigenu-1 (LFA-1), (Nolte-’t Hoen et al., 2009). Data v této práci ukazují zvýšenou přítomnost HLA-DQ v T lymfocytech po expozici KM3-CeD ve srovnání s KM3-CTL nebo KM1. Zatímco u naivních T lymfocytů vystavených KM1 nebyl evidentní téměř žádný nárůst positivity na HLA-DQ, v T lymfocytech vystavených KM3-CTL byl signál koncentrován na plazmatické membráně a v případě vystavení KM3-CeD byla buněčná distribuce HLA-DQ lokalizována více v cytosolu než na plazmatické membráně, což svědčí spíše o exozomálním transmembránovém transportu než membránové fúzi. Souhrnem, výsledky této disertační práce mohou v budoucnosti pomoci pochopit mechanismus komunikace mezi buňkami imunitního systému představující most mezi vrozenou a adaptivní imunitou. Již dnes jsou exozomy studovány za účelem navržení cílené léčby autoimunitních dysbalancí (Ortega, Martinez-Arroyo, Forner, & Cortes, 2021).

T regulační lymfocyty (Treg) mají důležitou roli při udržování tolerance. Jsou známé dvě monogenní poruchy vedoucí k nedostatečné funkci Treg a rozvoji autoimunitních reakcí. Patologická mutace v genu *AIRE* způsobuje autoimunitní polyendokrino-patii a patologická mutace v genu *FOXP3* je příčinou selhání periferní tolerance vlivem nedostatečné funkce Treg (Bennett et al., 2001). Analýza Treg je problematická, protože dodnes není ustálený fenotyp, podle kterého je možné Treg selektovat. Dalším limitem je

velmi nízký počet této lymfocytární subpopulace v krvi, 6 % ze všech CD4+ T lymfocytů (Rodríguez-Perea, Arcia, Rueda, & Velilla, 2016). Jedna z mnoha akceptovaných selekčních strategií představuje výběr expresního fenotypu CD4+CD25+FOXP3+CD127- (Grant, Liberal, Mieli-Vergani, Vergani, & Longhi, 2015). Bylo zjištěno, že u CeD pacientů jsou přítomny CD4+CD25+FOXP3+ Treg, ale jejich funkce k navození periferní tolerance je nedostatečná (Granzotto et al., 2009). Publikace z roku 2017 (Cook et al., 2017) ukázala CD4+CD127-CD25+CD39+FOXP3+ populaci Treg cirkulující v periferní krvi CeD pacientů, která se vyselektovala po požití lepku a byla gliadin specifická. I přes specifitu na antigen nedokázala tato subpopulace T lymfocytů nastavit toleranci imunitního systému. Publikace tedy demonstrují neschopnost imunitního systému zabránit vzniku autoimunitní reakce, avšak počet Treg byl nezměněn. Tato práce oproti tomu dokumentuje, že u pacientů s CeD při exozomální stimulaci je nedostatečná indukce transformace CD4+CD25+CD127- Treg. Vysvětlením této diskrepance výsledků může být odlišný způsob stimulace. Cook et al. analyzovali lymfocyty izolované z periferní krve pacientů s CeD po senzibilizaci lepkem přirozenou cestou. Na Treg tedy měla vliv celková odpověď imunitního systému (Cook et al., 2017). Granzotto et al. použili opět lymfocyty izolované z periferní krve CeD pacientů. T lymfocyty byly stimulovány protilátkami proti CD3 a CD28 po dobu 4 dní, což méně odpovídá přirozené odpovědi Treg (Granzotto et al., 2009). Na druhé straně, k podobným závěrům, jako jsou v této práci, došli Asri et al. (Asri et al., 2022). CD4+CD25+FOXP3+ Treg izolované z periferní krve léčených CeD pacientů (GFD, z anglického gluten free diet) byly statisticky významně sníženy oproti zdravým dárčům. Je třeba také připomenout, že limitem všech těchto studií je obtížný přístup ke vzorkům lymfocytů z biopsie tenkého střeva.

Naivní CD4+ T lymfocyty na periférii se mohou transformovat na indukované Treg (iTreg), které konstitutivně exprimují CD25+ (receptor pro IL-2) a hrají ústřední roli v prevenci aktivace autoreaktivních T lymfocytů (Shevach, 2002). I když Treg představují pouze malé procento ze všech T lymfocytů, frekvence této subpopulace je zvýšena ve střevě a je zvláště důležitá pro nastavení tolerance vůči potravinovým alergenům a udržování imunitní homeostázy (Hadis et al., 2011; Josefowicz et al., 2012). Nutno zdůraznit, že absence Treg je spojena s patogenezí u několika modelů slizniční autoimunity, jakou je i CeD (Dominguez-Villar & Hafler, 2018). Zvýšená exprese CD25 byla evidentní u T lymfocytů vystavených KM3-CTL, což svědčí o jejich indukci v Treg. Pozoruhodná absence této transformace u T lymfocytů vystavených KM3-CeD nebo KM1 ukazuje na

snížení schopnosti daného kultivačního media navodit indukci Treg. Exprese CD127 nepřímo koreluje s autoimunitní supresivní funkcí Treg (H. Liu & Leung, 2006). Výsledky této disertační práce ukazují, že CD127 pozitivita je pozorovatelná u T lymfocytů vystavených pouze KM3-CTL, a nikoliv KM3-CeD. Nelze však s jistotou říci, zda faktor způsobující inhibici nebo nedostatečnou indukci Treg je exozomálního původu, nebo se jedná o jiný sekretovaný faktor obsažený v kultivačním mediu.

## 9. Závěry a zhodnocení cílů a hypotéz práce

Cílem této práce bylo objasnit roli HLA II. třídy a antigen prezentujících buněk (APC) v iniciaci a progresi autoimunitního onemocnění celiakie na *in vitro* modelu dendritických buněk diferencovaných z monocytů izolovaných z periferní krve dárců. Pro studium byly vybrány tři rodiny zahrnující zdravé členy a nemocné s celiakií. Za účelem dosažení nezbytných dat pro potvrzení hypotéz byly provedeny následující měření a testy:

Nejprve byly analyzovány monocyty izolované z periferní krve dárců. Byly stanoveny expresní profily molekul CD14, CD16, CD63 a CD33 pomocí metody průtokové cytometrie s cílem objasnit složení monocytárních subpopulací s imunostimulační funkcí u dárců. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ve frekvenci klasických, intermediárních či neklasických monocytů mezi pacienty s celiakií a zdravými kontrolami. Nebyl ani prokázán statisticky významný rozdíl ve frekvenci celkových monocytů mezi CeD pacienty a kontrolami. Byl však objeven specifický fenotypový profil exprese CD33 a CD64 na CD14<sup>+</sup> monocytech od CeD pacientů. CD33 i CD64 mají významnou imunomodulační úlohu. Receptor kyseliny sialové (CD33) se účastní inhibice fagocytózy. V práci byl prokázán jeho vliv na schopnost monocytů diferencovat se na APC. Tyto výsledky jsou v souladu s další analýzou, která našla statisticky významný rozdíl v indukcii diferenciace monocytů na dendritické buňky u CeD pacientů oproti kontrolám.

V další části této práce byly monocyty diferencovány na dendritické buňky. Byly stanoveny expresní profily molekul CD14, CD86, CD11c a HLA-DQ s cílem potvrdit funkční stav těchto buněk a objasnit rozdíl ve funkci zralých dendritických buněk mezi CeD pacienty a zdravými kontrolami. Expresní profil povrchových molekul byl stanoven opět pomocí metody průtokové cytometrie. Monocyty pacientů ukázaly statisticky významně vyšší míru indukce transformace na dendritické buňky oproti monocytům zdravých dárců. Zralé dendritické buňky CeD pacientů také prokázaly statisticky významně vyšší expresi HLA-DQ a CD86 v odpovědi na stimulaci PTG oproti dendritickým buňkám od kontrol.

Funkční stav dendritických buněk byl potvrzen kokultivací s T lymfocyty a stanovením stimulačních cytokinů z kultivačního media pomocí metody ELISA. Byla prokázána statisticky významně vyšší aktivace CD3<sup>+</sup> T lymfocytů po kokultivaci s dendritickými buňkami od CeD pacientů oproti zdravým kontrolám.

Imunomodulační efekt exozomů produkovaných dendritickými buňkami byl testován na T lymfocytech pomocí kokultivace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů z periferní krve dárců s izolovanými exozomy, získanými po kultivaci zralých dendritických buněk. Funkční změna T lymfocytů a indukce T regulačních lymfocytů (iTreg) byla ověřena pomocí metody průtokové cytometrie a ELISA. U CeD pacientů byl prokázán inverzní efekt exozomů na kultivované T lymfocyty. CD4<sup>+</sup> T lymfocyty byly statisticky významně více aktivované, avšak vykazovaly významně nižší schopnost indukce transformace do Treg. Toto pozorování je ve shodě s předešlými závěry a vysvětluje prozánětlivé nastavení imunitního systému. Selhání nastavení tolerance proti gliadinu a autoantigenům potvrzuje autoimunitní povahu této choroby. Významný posun představuje objev signálních sekvencí pro extracelulární transport do exozomů, nacházejících se v exonech vybraných alel genů *HLA-DQA1* a *HLA-DQB1*. Přítomnost HLA molekul a antigenních peptidů v exozomech byla v minulosti již potvrzena. Stejně tak je známo, že exozomy jsou schopné nést nekódující RNA s regulační funkcí, které ovlivňují exprese v cílové buňce, ale dosud nebyla v nich prokázána přítomnost mRNA transkriptu HLA genů. Transport mRNA představuje alternativní možný způsob regulace exprese dané molekuly bez nutnosti regulace transkripce dalších genů v cílové buňce.

Tato práce prokázala zvýšení pozitivitu pro HLA-DQ molekuly na T lymfocytech po kontaktu s exozomy. Existují dvě vysvětlení pro tyto výsledky. První model poskytuje vysvětlení prostou fúzí exozomů s cílovou buňkou a přenos HLA-DQ na cytoplazmatickou membránu. Druhý model, který tato práce nabízí, poskytuje vysvětlení pomocí translace transportovaného transkriptu. Tento model podporují výsledky, které ukazují vyšší frekvenci signálních sekvencí u rizikových alel genů *HLA-DQA1* i *HLA-DQB1*. Přítomnost HLA-DQ a CD86 na exozomech tak může mít funkci kostimulační při přímé interakci T lymfocytu s dendritickou buňkou, nebo signální pro komunikaci mezi těmito buňkami na větší vzdálenost. Toto poznání nabízí i možné klinické využití, kdy by mohla být modifikována informace nesená exozomy pro navození tolerance u CeD pacientů skrze indukci Treg, nebo regulována produkce exozomů dendritickými buňkami přes inhibici cílových receptorů pomocí protilátek. Avšak tyto terapeutické postupy vyžadují další výzkum.

## 10. Souhrn

Souhrnem této práce jsou tyto výsledky:

1) Specifický fenotypový expresní profil CD33 a CD64 na CD14<sup>+</sup> monocytech od CeD pacientů by mohl mít diagnostický i terapeutický přínos pro klinickou medicínu.

2) Vyšší míra indukce zrání a vyšší exprese HLA-DQ a CD86 u dendritických buněk CeD pacientů po stimulaci PTG prokazují specifické prozánětlivé nastavení imunitní odpovědi, které by se dalo využít v diagnostických postupech při potvrzení této choroby. Avšak je nutné připustit, že tato metoda je pro běžné zavedení pravděpodobně příliš náročná.

3) Dendritické buňky produkují exozomy, které nesou molekuly proteinů i mRNA příslušných genů *HLA-DQ*. Tyto exozomy s prozánětlivým účinkem jsou schopny rovněž navodit indukci transformace Treg a tím ovlivnit nastavení tolerance proti daným antigenům.

## 11. Summary

The summary of this work are the following results:

1) The specific phenotype expression profile of CD33 and CD64 on CD14+ monocytes of CeD patients could have diagnostic and therapeutic applications for the clinical medicine.

2) The higher rate of maturation induction and higher expression of HLA-DQ and CD86 in dendritic cells of CeD patients after PTG stimulation demonstrate the specific proinflammatory setting of the immune response that could be used in the diagnostic procedure for disease confirmation. However, it is necessary to admit that this method is probably too demanding for routine implementation.

3) Dendritic cells produce exosomes that carry molecules of proteins and mRNA of the relevant *HLA-DQ* genes. These exosomes with proinflammatory effect are also capable of inducing the transformation of Treg, and thereby influencing the tolerance setting against given antigens.

## 12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akimov, S. S., & Belkin, A. M. (2001). Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood*, 98(5), 1567–1576. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.5.1567>
- Akinrinmade, O. A., Chetty, S., Daramola, A. K., Islam, M. U., Thepen, T., & Barth, S. (2017). CD64: An attractive immunotherapeutic target for m1-type macrophage mediated chronic inflammatory diseases. *Biomedicines*, 5(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biomedicines5030056>
- Anderson, R. P., Degano, P., Godkin, A. J., Jewell, D. P., & Hill, A. V. S. (2000). In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nature Medicine*, 6(3), 337–342. <https://doi.org/10.1038/73200>
- Anel, A., Gallego-Lleyda, A., de Miguel, D., Naval, J., & Martínez-Lostao, L. (2019). Role of Exosomes in the Regulation of T-cell Mediated Immune Responses and in Autoimmune Disease. *Cells*, 8(2), 154. <https://doi.org/10.3390/cells8020154>
- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, Ø., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M. C., Lundin, K. E. A., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L. M., & McAdam, S. N. (2000). The intestinal T cell response to  $\alpha$ -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine*, 191(4), 603–612. <https://doi.org/10.1084/jem.191.4.603>
- Asri, N., Rostami-Nejad, M., Nikzamir, A., Aghamohamadi, E., Asadzadeh-Aghdaei, H., & Zali, M. R. (2022). Reduced frequency of circulating regulatory T cells and their related immunosuppressive mediators in treated celiac patients. *Molecular Biology Reports*, 49(9), 8527–8535. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07674-w>
- Azeem, W., Bakke, R. M., Appel, S., Oyan, A. M., & Kalland, K.-H. (2020). Dual Pro- and Anti-Inflammatory Features of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00438>
- Babron, M. C., Nilsson, S., Adamovic, S., Naluai, Å. T., Wahlström, J., Ascher, H., Ciclitira, P. J., Sollid, L. M., Partanen, J., Greco, L., Clerget-Darpoux, F., Holopainen, P., Karell, K., Collin, P., Mustalahti, K., Mäki, M., Clot, F., Hugot, J. P., D'Alfonso, S., ... Moodie, S. J. (2003). Meta and pooled analysis of European coeliac disease data. *European Journal of Human Genetics*, 11(11), 828–834. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201051>
- Bai, J. C., & Ciacci, C. (2017). World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 51(9), 755–768.

<https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000919>

- Batagov, A. O., Kuznetsov, V. A., & Kurochkin, I. V. (2011). Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nanovesicles. *BMC Genomics*, 12(Suppl 3), S18. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S3-S18>
- Beitnes, A. C. R., Ráki, M., Brottveit, M., Lundin, K. E. A., Jahnsen, F. L., & Sollid, L. M. (2012). Rapid accumulation of CD14 +CD11c + dendritic cells in gut mucosa of celiac disease after in vivo gluten challenge. *PLoS ONE*, 7(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033556>
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., & Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 27(1), 20–21. <https://doi.org/10.1038/83713>
- Bhattacharya, P., Gopisetty, A., Ganesh, B. B., Sheng, J. R., & Prabhakar, B. S. (2011). GM-CSF-induced, bone-marrow-derived dendritic cells can expand natural Tregs and induce adaptive Tregs by different mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(2), 235–249. <https://doi.org/10.1189/jlb.0310154>
- Bhattacharjee, A., Jung, J., Zia, S., Ho, M., Eskandari-Sedighi, G., St. Laurent, C. D., McCord, K. A., Bains, A., Sidhu, G., Sarkar, S., Plemel, J. R., & Macauley, M. S. (2021). The CD33 short isoform is a gain-of-function variant that enhances A $\beta$ 1–42 phagocytosis in microglia. *Molecular Neurodegeneration*, 16(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00443-6>
- Biagi, F., Campanella, J., Bianchi, P. I., Zanellati, G., Capriglione, I., Klersy, C., & Corazza, G. R. (2008). The incidence of coeliac disease in adult first degree relatives. *Digestive and Liver Disease*, 40(2), 97–100. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2007.10.004>
- Bodd, M., Ráki, M., Tollefsen, S., Fallang, L. E., Bergseng, E., Lundin, K. E. A., & Sollid, L. M. (2010). HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunology*, 3(6), 594–601. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.36>
- Bodil Roth, E., Theander, E., Londres, E., Sandberg-Wollheim, M., Larsson, Å., Sjöberg, K., & Stenberg, P. (2008). Pathogenesis of autoimmune diseases: Antibodies against transglutaminase, peptidylarginine deiminase and protein-bound citrulline in primary Sjögren's syndrome, multiple sclerosis and Alzheimer's disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 67(6), 626–631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02115.x>
- Buschow, S. I., Nolte-'t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, 10(10), 1528–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>

- Butcher, S. K., Chahal, H., Nayak, L., Sinclair, A., Henriquez, N. V., Sapey, E., O'Mahony, D., & Lord, J. M. (2001). Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans. *Journal of Leukocyte Biology*, 70(6), 881–886. <https://doi.org/10.1189/jlb.70.6.881>
- Butler, C. A., Popescu, A. S., Kitchener, E. J. A., Allendorf, D. H., Puigdemallivol, M., & Brown, G. C. (2021). Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation. *JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY*, 158(3), 621–639. <https://doi.org/10.1111/jnc.15327>
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso, A., Minutti, C. M., Pereira Da Costa, M., & Reis E Sousa, C. (2021). Dendritic Cells Revisited. *Annual Review of Immunology*, 39, 131–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053707>
- Choi, I., Cho, B., Kim, S. D., Park, D., Kim, J. Y., Park, C. G., Chung, D. H., Hwang, W. S., Lee, J. S., & Ahn, C. (2006). Molecular cloning, expression and functional characterization of miniature swine CD86. *MOLECULAR IMMUNOLOGY*, 43(5), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.02.016>
- Ciccocioppo, R., Di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 140(3), 408–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x>
- Cinova, J., Palová-Jelínková, L., Smythies, L. E., Cerná, M., Pecharová, B., Dvůrák, M., Fruhauf, P., Tlaskalová-Hogenová, H., Smith, P. D., & Tucková, L. (2007). Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *Journal of Clinical Immunology*, 27(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/s10875-006-9061-z>
- Cook, L., Munier, C. M. L., Seddiki, N., van Bockel, D., Ontiveros, N., Hardy, M. Y., Gillies, J. K., Levings, M. K., Reid, H. H., Petersen, J., Rossjohn, J., Anderson, R. P., Zaunders, J. J., Tye-Din, J. A., & Kelleher, A. D. (2017). Circulating gluten-specific FOXP3+CD39+ regulatory T cells have impaired suppressive function in patients with celiac disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(6), 1592-1603.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.015>
- Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., & Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: Functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO Journal*, 33(10), 1104–1116. <https://doi.org/10.1002/embj.201488027>
- Dickson, B. C., Streutker, C. J., & Chetty, R. (2006). Coeliac disease: An update for pathologists. *Journal of Clinical Pathology*, 59(10), 1008–1016. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.035345>
- Diehl, M., Münz, C., Keilholz, W., Stevanović, S., Holmes, N., Loke, Y. W., & Rammensee, H. G. (1996). Nonclassical HLA-G molecules are classical peptide presenters. *Current Biology*, 6(3), 305–314. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00481-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00481-5)

- Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O., & Schuppan, D. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, 3(7), 797–801. <https://doi.org/10.1038/nm0797-797>
- Dominguez-Villar, M., & Hafler, D. A. (2018). Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature Immunology*, 19(7), 665–673. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0120-4>
- du Pre, M. F., van Berkel, L. A., Raki, M., van Leeuwen, M. A., de Ruiter, L. F., Broere, F., ter Borg, M. N. D., Lund, F. E., Escher, J. C., Lundin, K. E. A., Sollid, L. M., Kraal, G., Nieuwenhuis, E. E. S., & Samsom, J. N. (2011). CD62L(neg)CD38(+) Expression on Circulating CD4(+) T Cells Identifies Mucosally Differentiated Cells in Protein Fed Mice and in Human Celiac Disease Patients and Controls. *AMERICAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*, 106(6), 1147–1159. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.24>
- Efthymakis, K., Bologna, G., Simeone, P., Pierdomenico, L., Catitti, G., Vespa, S., Milano, A., De Bellis, D., Laterza, F., Pandolfi, A., Pipino, C., Sallese, M., Marchisio, M., Miscia, S., Neri, M., & Lanuti, P. (2023). Circulating Extracellular Vesicles Are Increased in Newly Diagnosed Celiac Disease Patients. *Nutrients*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu15010071>
- Fasano, A., Araya, M., Bhatnagar, S., Cameron, D., Catassi, C., Dirks, M., Mearin, M., Ortigosa, L., & Phillips, A. (2008). Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Consensus Report on Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 47(2), 214–219. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318181afed>
- Ferlazzo, G., Spaggiari, G. M., Semino, C., Melioli, G., & Moretta, L. (2000). Engagement of CD33 surface molecules prevents the generation of dendritic cells from both monocytes and CD34+ myeloid precursors. *European Journal of Immunology*, 30(3), 827–833. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200003\)30:3<827::AID-IMMU827>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200003)30:3<827::AID-IMMU827>3.0.CO;2-1)
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2017). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology*, 198(3), 986–992. <https://doi.org/10.1038/ni904>
- Fossati, G., Moots, R. J., Bucknall, R. C., & Edwards, S. W. (2002). Differential role of neutrophil Fcγ receptor IIIb (CD16) in phagocytosis, bacterial killing, and responses to immune complexes. *Arthritis and Rheumatism*, 46(5), 1351–1361. <https://doi.org/10.1002/art.10230>
- Frisoni, G. B., Carabellese, N., Longhi, M., Geroldi, C., Bianchetti, A., Govoni, S., Cattaneo, R., & Trabucchi, M. (1997). Is celiac disease associated with Alzheimer's disease? *Acta Neurologica Scandinavica*, 95(3), 147–151. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1997.tb00086.x>
- Fu, C., Peng, P., Loschko, J., Feng, L., Pham, P., Cui, W., Lee, K. P., Krug, A. B., & Jiang, A. (2020). Plasmacytoid dendritic cells cross-prime naive CD8 T cells by transferring antigen to

- conventional dendritic cells through exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(38), 23730–23741. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002345117>
- Gaudino, S. J., & Kumar, P. (2019). Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Frontiers in Immunology*, 10(MAR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00360>
- Ghali, J. R., Alikhan, M. A., Holdsworth, S. R., & Kitching, A. R. (2017). Induced regulatory T cells are phenotypically unstable and do not protect mice from rapidly progressive glomerulonephritis. *Immunology*, 150(1), 100–114. <https://doi.org/10.1111/imm.12671>
- Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Grant, C. R., Liberal, R., Mieli-Vergani, G., Vergani, D., & Longhi, M. S. (2015). Regulatory T-cells in autoimmune diseases: Challenges, controversies and-yet-unanswered questions. *Autoimmunity Reviews*, 14(2), 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.012>
- Granzotto, M., Dal Bo, S., Quaglia, S., Tommasini, A., Piscianz, E., Valencic, E., Ferrara, F., Martellosi, S., Ventura, A., & Not, T. (2009). Regulatory T-cell function is impaired in celiac disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 54(7), 1513–1519. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0501-x>
- Grip, O., Bredberg, A., Lindgren, S., & Henriksson, G. (2007). Increased subpopulations of CD16+ and CD56+ blood monocytes in patients with active Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13(5), 566–572. <https://doi.org/10.1002/ibd.20025>
- Guay, C., Kruit, J. K., Rome, S., Menoud, V., Mulder, N. L., Jurdzinski, A., Mancarella, F., Sebastiani, G., Donda, A., Gonzalez, B. J., Jandus, C., Bouzakri, K., Pinget, M., Boitard, C., Romero, P., Dotta, F., & Regazzi, R. (2019). Lymphocyte-Derived Exosomal MicroRNAs Promote Pancreatic  $\beta$  Cell Death and May Contribute to Type 1 Diabetes Development. *Cell Metabolism*, 29(2), 348–361.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.09.011>
- Guo, J., & Zhou, X. (2015). Regulatory T cells turn pathogenic. *Cellular and Molecular Immunology*, 12(5), 525–532. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.12>
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., Qasim, M., & Kim, J. H. (2019). Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cells8040307>
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., & Pabst, O. (2011). Intestinal Tolerance Requires Gut Homing and Expansion of FoxP3+ Regulatory T Cells in the Lamina Propria. *Immunity*, 34(2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.01.016>

- Halttunen, T., & Maki, M. (1999). Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology*, *116*(3), 566–572. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70178-2](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70178-2)
- Holland, C. J., Cole, D. K., & Godkin, A. (2013). Re-directing CD4+ T cell responses with the flanking residues of MHC class II-bound peptides: The core is not enough. *Frontiers in Immunology*, *4*(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00172>
- Hudec, M., Riegerová, K., Pala, J., Kútina, V., Černá, M., & O’Leary, V. B. (2021). Celiac disease defined by over-sensitivity to gliadin activation and superior antigen presentation of dendritic cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22189982>
- Hüe, S., Mention, J. J., Monteiro, R. C., Zhang, S. L., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V., Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., & Caillat-Zucman, S. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, *21*(3), 367–377. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.018>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., Mearin, M. L., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Troncone, R., Auricchio, R., Castillejo, G., Christensen, R., Dolinsek, J., Gillett, P., Hróbjartsson, A., Koltai, T., Maki, M., Nielsen, S. M., Popp, A., Størdal, K., ... Wessels, M. (2020). European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *70*(1), 141–156. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002497>
- Hviid, T. V. F. (2006). HLA-G in human reproduction: Aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Human Reproduction Update*, *12*(3), 209–232. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi048>
- Ishitani, A., Sageshima, N., & Hatake, K. (2006). The involvement of HLA-E and -F in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, *69*(2), 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2005.10.004>
- Ito, Y., Ashenberg, O., Pyrdol, J., Luoma, A. M., Rozenblatt-Rosen, O., Hofree, M., Christian, E., De Andrade, L. F., Tay, R. E., Teyton, L., Regev, A., Dougan, S. K., & Wucherpfennig, K. W. (2018). Rapid CLIP dissociation from MHC II promotes an unusual antigen presentation pathway in autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, *215*(10), 2617–2635. <https://doi.org/10.1084/JEM.20180300>
- Jeannin, P., Magistrelli, G., Aubry, J. P., Caron, G., Gauchat, J. F., Renno, T., Herbault, N., Goetsch, L., Blaecke, A., Dietrich, P. Y., Bonnefoy, J. Y., & Delneste, Y. (2000). Soluble CD86 is a costimulatory molecule for human T lymphocytes. *IMMUNITY*, *13*(3), 303–312. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00030-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00030-3)

- Josefowicz, S. Z., Niec, R. E., Kim, H. Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D. T., & Rudensky, A. Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal T H 2 inflammation. *Nature*, 482(7385), 395–399. <https://doi.org/10.1038/nature10772>
- Kagnoff, M. F., Austin, R. K., Hubert, J. J., Bernardin, J. E., & Kasarda, D. D. (1984). Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *Journal of Experimental Medicine*, 160(5), 1544–1557. <https://doi.org/10.1084/jem.160.5.1544>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kanamori, M., Nakatsukasa, H., Okada, M., Lu, Q., & Yoshimura, A. (2016). Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends in Immunology*, 37(11), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.012>
- Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human monocyte subsets and phenotypes in major chronic inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>
- Kim, C. Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C., & Sollid, L. M. (2004). Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), 4175–4179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306885101>
- King, J. A., Jeong, J., Underwood, F. E., Quan, J., Panaccione, N., Windsor, J. W., Coward, S., Debruyne, J., Ronksley, P. E., Shaheen, A. A., Quan, H., Godley, J., Veldhuyzen Van Zanten, S., Lebwohl, B., Ng, S. C., Ludvigsson, J. F., & Kaplan, G. G. (2020). Incidence of Celiac Disease Is Increasing over Time: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 115(4), 507–525. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000523>
- Klein, J., & O’Hugin, C. (1994). The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(14), 6251–6252. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.14.6251>
- Kondělková, K., Vokurková, D., Krejsek, J., Borská, L., Fiala, Z., & Ctírad, A. (2010). Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*, 53(2), 73–77. <https://doi.org/10.14712/18059694.2016.63>
- Kovacs, A. A. Z., Kono, N., Wang, C. H., Wang, D., Frederick, T., Operskalski, E., Tien, P. C., French, A. L., Minkoff, H., Kassaye, S., Golub, E. T., Aouizerat, B. E., Kuniholm, M. H., & Millstein, J. (2020). Association of HLA genotype with T-cell activation in human immunodeficiency virus (HIV) and HIV/ hepatitis c virus-coinfected women. *Journal of Infectious Diseases*, 221(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiz589>

- Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), E968–E977. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521230113>
- Krüger, K., Büning, C., & Schriever, F. (2001). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+/CD16+ blood monocytes. *European Journal of Immunology*, 31(1), 48–56. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200101\)31:1<48::aid-immu48>3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200101)31:1<48::aid-immu48>3.0.co;2-5)
- Kumar, V., & Sercarz, E. (2001). An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes. *Immunological Reviews*, 182, 113–121. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2001.1820109.x>
- Kurki, A., Kemppainen, E., Laurikka, P., Kaukinen, K., & Lindfors, K. (2021). The use of peripheral blood mononuclear cells in celiac disease diagnosis and treatment. *EXPERT REVIEW OF GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY*, 15(3), 305–316. <https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1850262>
- Laupéze, B., Fardel, O., Onno, M., Bertho, N., Drénou, B., Fauchet, R., & Amiot, L. (1999). Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib and II molecules on monocytes and monocyte-derived dendritic and macrophagic cells. *Human Immunology*, 60(7), 591–597. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(99\)00025-7](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(99)00025-7)
- Lebwohl, B., Luchsinger, J. A., Freedberg, D. E., Green, P. H. R., & Ludvigsson, J. F. (2015). Risk of Dementia in Patients with Celiac Disease: A Population-Based Cohort Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 49(1), 179–185. <https://doi.org/10.3233/JAD-150388>
- Lebwohl, B., Ludvigsson, J. F., & Green, P. H. R. (2015). Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*, 351, h4347. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4347>
- Lebwohl, B., Sanders, D. S., & Green, P. H. R. (2018). Coeliac disease. *The Lancet*, 391(10115), 70–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31796-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31796-8)
- Lee, J. Y., Park, J. K., Lee, E. Y., Lee, E. B., & Song, Y. W. (2016). Circulating exosomes from patients with systemic lupus erythematosus induce a proinflammatory immune response. *Arthritis Research and Therapy*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1159-y>
- Lejeune, T., Meyer, C., & Abadie, V. (2021). B Lymphocytes Contribute to Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology*, 160(7), 2608–2610.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.063>
- Li, Y., Lee, P. Y., Sobel, E. S., Narain, S., Satoh, M., Segal, M. S., Reeves, W. H., & Richards, H. B. (2009). Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Research and Therapy*, 11(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1186/ar2590>

- Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Amarri, S., Barbato, M., Barbera, C., Barera, G., Bellantoni, A., Castellano, E., Guariso, G., Limongelli, M. G., Pellegrino, S., Polloni, C., Ughi, C., Zuin, G., Fasano, A., & Catassi, C. (2014). Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *New England Journal of Medicine*, 371(14), 1295–1303. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400697>
- Liu, H., & Leung, B. P. (2006). CD4+CD25+ REGULATORY T CELLS IN HEALTH AND DISEASE. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(5–6), 519–524. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04401.x>
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Barbara, B. F., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., & Bluestone, J. A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *Journal of Experimental Medicine*, 203(7), 1701–1711. <https://doi.org/10.1084/jem.20060772>
- Loisel, D. A., Alberts, S. C., & Ober, C. (2007). Functional significance of MHC variation in mate choice, reproductive outcome, and disease risk. In *Evolution in Health and Disease* (Vol. 15, Issue 1, pp. 95–108). Oxford University PressOxford. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0008>
- Longhi, M. S., Ma, Y., Bogdanos, D. P., Cheeseman, P., Mieli-Vergani, G., & Vergani, D. (2004). Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *Journal of Hepatology*, 41(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.03.008>
- Lundin, K. E. A., & Wijmenga, C. (2015). Coeliac disease and autoimmune disease - Genetic overlap and screening. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 12(9), 507–515. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.136>
- Ma, D. Y., & Clark, E. A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 21(5), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.010>
- Maccari, G., Robinson, J., Hammond, J. A., & Marsh, S. G. E. (2020). The IPD Project: a centralised resource for the study of polymorphism in genes of the immune system. *Immunogenetics*, 72(1–2), 49–55. <https://doi.org/10.1007/s00251-019-01133-w>
- Mäki, M., & Collin, P. (1997). Coeliac disease. *The Lancet*, 349(9067), 1755–1759. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)70237-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)70237-4)
- Malamut, G., Matysiak-Budnik, T., Grosdider, E., Jais, J. P., Morales, E., Damotte, D., Caillat-Zucman, S., Brousse, N., Cerf-Bensussan, N., Jian, R., & Cellier, C. (2008). Adult celiac disease with severe or partial villous atrophy: A comparative study. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 32(3), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.gcb.2008.02.011>

- Man-, B. (1999). Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex The MHC sequencing consortium \*. *October*, 401(October), 921–923.
- Marsh, M. N. (1992). Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, 102(1), 330–354. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91819-P](https://doi.org/10.1016/0016-5085(92)91819-P)
- Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Fernández-Viña, M., Geraghty, D. E., Holdsworth, R., Hurley, C. K., Lau, M., Lee, K. W., Mach, B., Maiers, M., Mayr, W. R., Müller, C. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., ... Trowsdale, J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75(4), 291–455. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01466.x>
- Matysiak-Budnik, T., Moura, I. C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Ménard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., Van Niel, G., Bouhnik, Y., Lamarque, D., Chaussade, S., Malamut, G., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., Monteiro, R. C., & Heyman, M. (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1), 143–154. <https://doi.org/10.1084/jem.20071204>
- Mbongue, J. C., Nieves, H. A., Torrez, T. W., & Langridge, W. H. R. (2017). The role of dendritic cell maturation in the induction of insulin-dependent diabetes mellitus. *Frontiers in Immunology*, 8(MAR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00327>
- Menezes, S., Melandri, D., Anselmi, G., Perchet, T., Loschko, J., Dubrot, J., Patel, R., Gautier, E. L., Hugues, S., Longhi, M. P., Henry, J. Y., Quezada, S. A., Lauvau, G., Lennon-Duménil, A. M., Gutiérrez-Martínez, E., Bessis, A., Gomez-Perdiguerro, E., Jacome-Galarza, C. E., Garner, H., ... Guernonprez, P. (2016). The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity*, 45(6), 1205–1218. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.12.001>
- Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T. N., Raulet, D. H., Lanier, L. L., Groh, V., Spies, T., Ebert, E. C., Green, P. H., & Jabri, B. (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 21(3), 357–366. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.06.020>
- Moerkens, R., Mooiweer, J., Withoff, S., & Wijmenga, C. (2019). Celiac disease-on-chip: Modeling a multifactorial disease in vitro. *UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY JOURNAL*, 7(4), 467–476. <https://doi.org/10.1177/2050640619836057>
- Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W. J., Beer-Stolz, D., & Vujanovic, N. L. (2012). Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF

- superfamily ligands. *OncoImmunology*, 1(7), 1074–1083. <https://doi.org/10.4161/onci.20897>
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M.-H., Gasparin, M., Bravi, E., & Mäki, M. (2010). The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, 42(8), 587–595. <https://doi.org/10.3109/07853890.2010.505931>
- Ng, P. C., Li, G., Chui, K. M., Chu, W. C. W., Li, K., Wong, R. P. O., Chik, K. W., Wong, E., & Fok, T. F. (2004). Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection. *PEDIATRIC RESEARCH*, 56(5), 796–803. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000142586.47798.5E>
- Nieuwenhuizen, W. F., Pieters, R. H. H., Knippels, L. M. J., Jansen, M. C. J. F., & Koppelman, S. J. (2003). Is *Candida albicans* a trigger in the onset of coeliac disease? *Lancet*, 361(9375), 2152–2154. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13695-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13695-1)
- Nolte-’t Hoen, E. N. M., Buschow, S. I., Anderton, S. M., Stoorvogel, W., & Wauben, M. H. M. (2009). Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*, 113(9), 1977–1981. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-174094>
- Nouri-Shirazi, M., Banchereau, J., Bell, D., Burkeholder, S., Kraus, E. T., Davoust, J., & Palucka, K. A. (2000). Dendritic Cells Capture Killed Tumor Cells and Present Their Antigens to Elicit Tumor-Specific Immune Responses. *The Journal of Immunology*, 165(7), 3797–3803. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3797>
- Nussbaum, L., Chen, Y. L., & Ogg, G. S. (2021). Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *British Journal of Dermatology*, 184(1), 14–24. <https://doi.org/10.1111/bjd.19380>
- O’Callaghan, C. A., & Bell, J. I. (1998). Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological Reviews*, 163(6), 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01192.x>
- O’Leary, V. B., Ovsepian, S. V., Carrascosa, L. G., Buske, F. A., Radulovic, V., Niyazi, M., Moertl, S., Trau, M., Atkinson, M. J., & Anastasov, N. (2015). PARTICLE, a triplex-forming long ncRNA, regulates locus-specific methylation in response to low-dose irradiation. *Cell Reports*, 11(3), 474–485. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.043>
- Ohl, K., & Tenbrock, K. (2015). Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *European Journal of Immunology*, 45(2), 344–355. <https://doi.org/10.1002/eji.201344280>
- Ortega, A., Martinez-Arroyo, O., Forner, M. J., & Cortes, R. (2021). Exosomes as drug delivery systems: Endogenous nanovehicles for treatment of systemic lupus erythematosus. *Pharmaceutics*, 13(1), 1–28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010003>
- Ożańska, A., Szymczak, D., & Rybka, J. (2020). Pattern of human monocyte subpopulations in

- health and disease. *Scandinavian Journal of Immunology*, 92(1), 1–13.  
<https://doi.org/10.1111/sji.12883>
- Palová-Jelínková, L., Rožková, D., Pecharová, B., Bártová, J., Šedivá, A., Tlaskalová-Hogenová, H., Spíšek, R., & Tučková, L. (2005). Gliadin Fragments Induce Phenotypic and Functional Maturation of Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 175(10), 7038–7045.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.7038>
- Petzold, C., Riewaldt, J., Koenig, T., Schallenberg, S., & Kretschmer, K. (2010). Dendritic Cell-Targeted Pancreatic  $\beta$ -Cell Antigen Leads to Conversion of Self-Reactive CD4 + T Cells Into Regulatory T Cells and Promotes Immunotolerance in NOD Mice . *The Review of Diabetic Studies*, 7(1), 47–61. <https://doi.org/10.1900/rds.2010.7.47>
- Prokopová, L. (2008). CELIAKIE – CO MÁ VĚDĚT AMBULANTNÍ INTERNISTA. *Interní Medicína pro Praxi*, 10(5), 233–239.
- Qiao, S., Bergseng, E., Molberg, Ø., Xia, J., Fleckenstein, B., Khosla, C., & Sollid, L. M. (2004). Antigen Presentation to Celiac Lesion-Derived T Cells of a 33-Mer Gliadin Peptide Naturally Formed by Gastrointestinal Digestion. *The Journal of Immunology*, 173(3), 1757–1762.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.3.1757>
- Ráki, M., Tollefsen, S., Molberg, Ø., Lundin, K. E. A., Sollid, L. M., & Jahnsen, F. L. (2006). A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology*, 131(2), 428–438.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.06.002>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. M., & Geuze, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*, 183(3), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Reith, W., LeibundGut-Landmann, S., & Waldburger, J. M. (2005). Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Reviews Immunology*, 5(10), 793–806.  
<https://doi.org/10.1038/nri1708>
- Robinson, J., Halliwell, J. A., McWilliam, H., Lopez, R., & Marsh, S. G. E. (2013). IPD - The Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), 1234–1240.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1140>
- Roche, P. A., & Furuta, K. (2015). The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*, 15(4), 203–216.  
<https://doi.org/10.1038/nri3818>
- Rodríguez-Perea, A. L., Arcia, E. D., Rueda, C. M., & Velilla, P. A. (2016). Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. *Clinical and Experimental Immunology*, 185(3), 281–291. <https://doi.org/10.1111/cei.12804>

- Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., & Wagner, U. (2012). The CD14 brightCD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and Rheumatism*, 64(3), 671–677. <https://doi.org/10.1002/art.33418>
- Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., & Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset: I. Evidence for the active participation of T cells in natural selftolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *Journal of Experimental Medicine*, 161(1), 72–87. <https://doi.org/10.1084/jem.161.1.72>
- Sánchez, D., Tučková, L., Šebo, P., Michalak, M., Whelan, A., Šterzl, I., Jelínková, L., Havrdová, E., Imramovská, M., Beneš, Z., Krupičková, S., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2000). Occurrence of IgA and IgG autoantibodies to calreticulin in coeliac disease and various autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 15(4), 441–449. <https://doi.org/10.1006/jaut.2000.0452>
- Schlitzer, A., McGovern, N., & Ginhoux, F. (2015). Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 41, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.03.011>
- Schumann, M., Siegmund, B., Schulzke, J. D., & Fromm, M. (2017). Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cmgh*, 3(2), 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.006>
- Selmaj, I., Mycko, M. P., Raine, C. S., & Selmaj, K. W. (2017). The role of exosomes in CNS inflammation and their involvement in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 306, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.02.002>
- Sen, A., Chowdhury, I. H., Mukhopadhyay, D., Paine, S. K., Mukherjee, A., Mondal, L. K., Chatterjee, M., & Bhattacharya, B. (2011). Increased Toll-like Receptor-2 Expression on Nonclassic CD16 + Monocytes from Patients with Inflammatory Stage of Eales' Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(9), 6940. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7834>
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., & Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in Celiac Sprue. *Science*, 297(5590), 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.1074129>
- Shevach, E. M. (2002). CD4+CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. *Nature Reviews Immunology*, 2(6), 389–400. <https://doi.org/10.1038/nri821>
- Shevach, E. M., Davidson, T. S., Huter, E. N., DiPaolo, R. A., & Andersson, J. (2008). Role of TGF-β in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *Journal of Clinical Immunology*, 28(6), 640–646. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9240-1>
- Shiina, T., Hosomichi, K., Inoko, H., & Kulski, J. K. (2009). The HLA genomic loci map:

- Expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics*, 54(1), 15–39. <https://doi.org/10.1038/jhg.2008.5>
- Sollid, L. M., Molberg, M., McAdam, S., & Lundin, K. E. A. (1997). Autoantibodies in coeliac disease: Tissue transglutaminase guilt by association? *Gut*, 41(6), 851–852. <https://doi.org/10.1136/gut.41.6.851>
- Sollid, Ludvig M. (2002). Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology*, 2(9), 647–655. <https://doi.org/10.1038/nri885>
- Sollid, Ludvig M., & Jabri, B. (2005). Is celiac disease an autoimmune disorder? *Current Opinion in Immunology*, 17(6), 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.09.015>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). IDENTIFICATION OF A NOVEL CELL TYPE IN PERIPHERAL LYMPHOID ORGANS OF MICE. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Stepniak, D., & Koning, F. (2006). Celiac Disease-Sandwiched between Innate and Adaptive Immunity. In *Human Immunology* (Vol. 67, Issue 6, pp. 460–468). <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2006.03.011>
- Šumník, Z., Koloušková, S., Cinek, O., Kotalová, R., Vavřinec, J., & Šnajderová, M. (2000). HLA &#150; DQA1\*05-DQB1\*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. *Acta Paediatrica*, 89(12), 1426–1430. <https://doi.org/10.1080/080352500456589>
- Szałowska, D., & Bak-Romaniszyn, L. (2013). Family recognition of celiac disease. *Przegląd Gastroenterologiczny*, 8(6), 390–395. <https://doi.org/10.5114/pg.2013.39923>
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., & Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: Induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology*, 10(12), 1969–1980. <https://doi.org/10.1093/intimm/10.12.1969>
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., & Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine*, 192(2), 303–309. <https://doi.org/10.1084/jem.192.2.303>
- Taneja, V., & David, C. S. (1999). HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunological Reviews*, 169(1), 67–79. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1999.tb01307.x>
- Tarbell, K. V., Petit, L., Zuo, X., Toy, P., Luo, X., Mqadmi, A., Yang, H., Suthanthiran, M., Mojsov, S., & Steinman, R. M. (2007). Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *Journal of Experimental Medicine*, 204(1), 191–201. <https://doi.org/10.1084/jem.20061631>

- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *The Journal of Immunology*, 166(12), 7309–7318. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
- Thorsby, E., & Lie, B. A. (2005). HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *TRANSPLANT IMMUNOLOGY*, 14(3–4), 175–182. <https://doi.org/10.1016/j.trim.2005.03.021>
- Triantafilou, M., & Triantafilou, K. (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in Immunology*, 23(6), 301–304. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02233-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02233-0)
- Turley, S. J., Inaba, K., Garrett, W. S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R. M., & Mellman, I. (2000). Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science*, 288(5465), 522–527. <https://doi.org/10.1126/science.288.5465.522>
- Tye-Din, J. A., Galipeau, H. J., & Agardh, D. (2018). Celiac disease: A review of current concepts in pathogenesis, prevention, and novel therapies. *Frontiers in Pediatrics*, 6(November), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00350>
- Ulyanova, T., Blasioli, J., Woodford-Thomas, T. A., & Thomas, M. L. (1999). The sialoadhesin CD33 is a myeloid-specific inhibitory receptor. *European Journal of Immunology*, 29(11), 3440–3449. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199911\)29:11<3440::AID-IMMU3440>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199911)29:11<3440::AID-IMMU3440>3.0.CO;2-C)
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., Van Rood, J. J., Spaenij, L., & Koning, F. (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12390–12395. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135229100>
- Van Belzen, M. J., Meijer, J. W. R., Sandkuijl, L. A., Bardoel, A. F. J., Mulder, C. J. J., Pearson, P. L., Houwen, R. H. J., & Wijmenga, C. (2003). A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology*, 125(4), 1032–1041. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01205-8](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01205-8)
- Van De Wal, Y., Kooy, Y. M. C., Van Veelen, P., Vader, W., August, S. A., Drijfhout, J. W., Peña, S. A., & Koning, F. (1999). Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *European Journal of Immunology*, 29(10), 3133–3139. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3133::AID-IMMU3133>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3133::AID-IMMU3133>3.0.CO;2-G)
- Varol, C., Landsman, L., Fogg, D. K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., & Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic,

- conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(1), 171–180. <https://doi.org/10.1084/jem.20061011>
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L., & Hafler, D. A. (2004). Loss of Functional Suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 199(7), 971–979. <https://doi.org/10.1084/jem.20031579>
- Villar, J., & Segura, E. (2020). Decoding the Heterogeneity of Human Dendritic Cell Subsets. *Trends in Immunology*, 41(12), 1062–1071. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.002>
- Vilppula, A., Collin, P., Mäki, M., Valve, R., Luostarinen, M., Krekelä, I., Patrikainen, H., Kaukinen, K., & Luostarinen, L. (2008). Undetected coeliac disease in the elderly. *Digestive and Liver Disease*, 40(10), 809–813. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.03.013>
- Visser, J., Rozing, J., Sapone, A., Lammers, K., & Fasano, A. (2009). Tight Junctions, Intestinal Permeability, and Autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165(1), 195–205. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04037.x>
- Wolf, A. A., Yáñez, A., Barman, P. K., & Goodridge, H. S. (2019). The ontogeny of monocyte subsets. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01642>
- Wong, K. L., Tai, J. J. Y., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., Kourilsky, P., & Wong, S. C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), 16–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-326355>
- Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J. Y., Ong, S. M., Dang, T. M., & Wong, S. C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunologic Research*, 53(1–3), 41–57. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C., Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14 , a Receptor for Complexes of Lipopolysaccharide ( LPS ) and LPS Binding Protein Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2878193> JSTOR is a not-for-profit service that helps scholars. *Science*, 249(4975), 1431–1433.
- Wubbolts, R., Leckie, R. S., Veenhuizen, P. T. M., Schwarzmann, G., Möbius, W., Hoernschemeyer, J., Slot, J. W., Geuze, H. J., & Stoorvogel, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes: Potential implications for their function and multivesicular body formation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), 10963–10972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207550200>
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J. M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B. A., Sverdrup, F. M., Head, R., Kuster, D. J., Ruminiski, P., Weiss, D., Von Schack,

- D., & Bluestone, J. A. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 209(10), 1713–1722. <https://doi.org/10.1084/jem.20120822>
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., & Steinman, R. M. (2003). Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 235–247. <https://doi.org/10.1084/jem.20030422>
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Williams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., & Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.12.001>
- Zajacova, M., Kotrbova-Kozak, A., & Cerna, M. (2016). HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 genotyping of 180 Czech individuals from the Czech Republic pop 3. *Human Immunology*, 77(4), 365–366. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.02.003>
- Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., & Heine, G. H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood*, 118(12), e50–e61. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-326827>
- Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S., & Horwitz, D. A. (2002). Generation Ex Vivo of TGF- $\beta$ -Producing Regulatory T Cells from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>–</sup> Precursors. *The Journal of Immunology*, 169(8), 4183–4189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4183>
- Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J. M., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74–e80. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>
- Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594–600. <https://doi.org/10.1038/nm0598-594>

### **13.      Publikační činnost autora**

1.    Hudec M, Dankova P, Solc R, Bettazova N, Cerna M. Epigenetic regulation of circadian rhythm and its possible role in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):1-18. doi:10.3390/ijms21083005
2.    Pokorná M, Hudec M, Juříčková I, et al. All-trans retinoic acid fosters the multifarious u87mg cell line as a model of glioblastoma. *Brain Sci.* 2021;11(6). doi:10.3390/brainsci11060812
3.    Hudec M, Riegerová K, Pala J, Kútna V, Černá M, O’Leary VB. Celiac disease defined by over-sensitivity to gliadin activation and superior antigen presentation of dendritic cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(18):1-14. doi:10.3390/ijms22189982
4.    Hudec M, Juříčková I, Riegerová K, Ovsepian S V., Černá M, O’Leary VB. Enhanced Extracellular Transfer of HLA-DQ Activates CD3+ Lymphocytes towards Compromised Treg Induction in Celiac Disease. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):6102. doi:10.3390/ijms23116102
5.    Juříčková I, Hudec M, Votava F, et al. The Immunological Epigenetic Landscape of the Human Life Trajectory. *Biomedicines.* 2022;10(11):2894. doi:10.3390/biomedicines10112894

#### **14. Publikace spojené s disertační prací**

##### **Příloha I.**

Celiac disease defined by over-sensitivity to gliadin activation and superior antigen presentation of dendritic cells

M. Hudec, K. Riegerová, J. Pala, V. Kútina, M. Černá, V. B. O'Leary.

International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(18):1-14.



Article

# Celiac Disease Defined by Over-Sensitivity to Gliadin Activation and Superior Antigen Presentation of Dendritic Cells

Michael Hudec <sup>1,\*</sup>, Kamila Riegerová <sup>2</sup>, Jan Pala <sup>3,4</sup>, Viera Kútina <sup>4</sup>, Marie Černá <sup>1</sup> and Valerie Bríd O'Leary <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Genetics, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague, Czech Republic; marie.cerna@lf3.cuni.cz (M.Č.); valerie.oleary@lf3.cuni.cz (V.B.O.)

<sup>2</sup> Department of Immunology and Clinical Biochemistry, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague, Czech Republic; kamila.riegerova@lf3.cuni.cz

<sup>3</sup> Department of Pathophysiology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 100 00 Prague, Czech Republic; jan.pala@lf3.cuni.cz

<sup>4</sup> Department of Experimental Neurobiology, National Institute of Mental Health, Topolova 748, 250 67 Klecany, Czech Republic; viera.kutina@nudz.cz

\* Correspondence: Michael.hudec@lf3.cuni.cz

**Citation:** Hudec, M.; Riegerov, K.; Pala, J.; Kútina V.; Černá M.; O'Leary, V.B. Celiac Disease Defined by Over-Sensitivity to Gliadin Activation and Superior Antigen Presentation of Dendritic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9982. <https://doi.org/10.3390/ijms22189982>

Academic Editors: Stephanie Gras, Jerome Le Nours, Christopher Szeto and Dimitra Chatzileontiadou

Received: 30 July 2021

Accepted: 13 September 2021

Published: 15 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The autoimmune condition, Celiac Disease (CeD), displays broad clinical symptoms due to gluten exposure. Its genetic association with DQ variants in the human leukocyte antigen (HLA) system has been recognised. Monocyte-derived mature dendritic cells (MoDCs) present gluten peptides through HLA-DQ and co-stimulatory molecules to T lymphocytes, eliciting a cytokine-rich microenvironment. Having access to CeD associated families prevalent in the Czech Republic, this study utilised an *in vitro* model to investigate their differential monocyte profile. The higher monocyte yields isolated from PBMCs of CeD patients versus control individuals also reflected the greater proportion of dendritic cells derived from these sources following lipopolysaccharide (LPS)/ peptic-tryptic-gliadin (PTG) fragment stimulation. Cell surface markers of CeD monocytes and MoDCs were subsequently profiled. This foremost study identified a novel bio-profile characterised by elevated CD64 and reduced CD33 levels, unique to CD14<sup>++</sup> monocytes of CeD patients. Normalisation to LPS stimulation revealed the increased sensitivity of CeD-MoDCs to PTG, as shown by CD86 and HLA-DQ flow cytometric readouts. Enhanced CD86 and HLA-DQ expression in CeD-MoDCs were revealed by confocal microscopy. Analysis highlighted their dominance at the CeD-MoDC membrane in comparison to controls, reflective of superior antigen presentation ability. In conclusion, this investigative study deciphered the monocytes and MoDCs of CeD patients with the identification of a novel bio-profile marker of potential diagnostic value for clinical interpretation. Herein, the characterisation of CD86 and HLA-DQ as activators to stimulants, along with robust membrane assembly reflective of efficient antigen presentation, offers CeD targeted therapeutic avenues worth further exploration.

**Keywords:** monocyte-derived dendritic cells; major histocompatibility complex II; autoimmunity; CD33; CD64; CD86; MHCDQ; monocyte

## 1. Introduction

Celiac disease (CeD) is a chronic autoimmune condition that affects 1–2 % of the general population, ensuing in genetically predisposed individuals that harbour variants of the human leukocyte antigen (HLA) system [1]. HLA class II are alpha (α)–beta (β) heterodimeric cell surface receptors found on antigen-presenting cells. The α and β chains are encoded by two adjacent loci, *HLA-DQA1* and *HLA-DQB1*, respectively, on chromosome 6p21.3 [2]. A serotyping system classifies the variant *HLA-DQ2* (alleles DQA1 \*05:01 /

DQB1 \*02:01) and *HLA-DQ8* (alleles *DQA1* \*03:01 / *DQB1* \*03:02) [3]. These cis-haplotype isoforms are directly associated with CeD [3,4].

Primarily affecting the small intestine, CeD manifests as a spectrum of broad clinical symptoms including fatigue, weight loss, anaemia, nausea, constipation or diarrhoea [5]. Pathological alterations include villous atrophy, crypt hyperplasia, inflammatory cell infiltration and activation [6]. CeD can be triggered by gluten, a combination of prolamin and glutelin proteins, which naturally occurs in wheat, barley, rye, oats and their cross hybrids [7]. Upon ingestion, gluten is incompletely cleaved into short peptides by gastric, pancreatic and brush border enzymes [8] that traverse the lamina propria of the small intestine via trans- or paracellular routes, activating a CeD autoimmune response [9–11]. Such gluten peptides are presented by monocyte-derived mature dendritic cells (DCs), through HLA-DQ and co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 to CD4 positive T lymphocytes, eliciting a cytokine- and chemokine-rich microenvironment accompanied by p38 MAP kinase phosphorylation [12,13]. There are changes in the proportional representation of monocytes, particularly intermediate or non-classical subpopulations, in autoimmune diseases [14,15]. Intermediate monocytes are able to overexpress HLA-II molecules [16] and, in common with the non-classical type, may play a role in CD8 cellular activation [17,18]. To date, limited knowledge exists on the differential monocyte profile in the context of the CeD immune response. Likewise, the differentiation of monocytic to dendritic cells needs to be deciphered in the context of HLA-DQ involvement within CeD cellular responses to gluten-derived peptides. Enhanced cytokine production from HLA-DQ2+ monocytes following gliadin stimulation has been noted in patients with active CeD compared with monocytes derived from healthy donors [19]. This work interpreted the comparative changes in monocytes and their derived dendritic cells in CeD individuals with a familial autoimmunity association against normal controls within the same pedigree background. Furthermore, this investigation elucidated the role of cell surface receptors such as CD86 and HLA-DQ expression profiles in monocyte-derived dendritic cells as potential controllers of gluten induction, leveraging CeD adaptive immunity towards self-targeting.

## 2. Results

### 2.1. High Prevalence of CeD in the Czech Republic with Study Participants Representing Autoimmune Disease Susceptibility Across Familial Generations.

According to the World Gastroenterology Organisation (WGO) Global 2016 guidelines [20], the Czech Republic is amongst the European countries with the highest prevalence of CeD (Figure 1A). While the highest incidence of CeD is found in Finland (2%), the percentage prevalence of CeD in the Czech Republic is 0.3% (1 in 218 individuals) [20]. Three Czech families (F-A, F-B, F-C) with a history of autoimmune disease participated in this study. Healthy controls within these families were also enrolled. Their pedigree overview is presented in Figure 1B, with CeD only affecting females arising in the second generation in F-B and F-C. Third generation females of F-A were affected by a combination of CeD and autoimmune inflammation of the thyroid gland (Figure 1B). Members of F-A, F-B and F-C had allergic reactions to many factors, especially pollen and dust mites (Figure 1C, Supplementary Table S1). From the available data, it was shown that CeD manifested by the second decade of life, with the earliest reported by age 5 years in a female from F-A (Figure 1D). Two participants elicited antigen positivity towards thyroid peroxidase antibody (TPO-ab) (Figure 1D). Six members across the three families had autoimmune inflammation of the thyroid gland. Members of these representative families donated peripheral whole blood with no statistically significant difference between generations in the proportion of monocytes isolated from this source (Supplementary Figure S1).

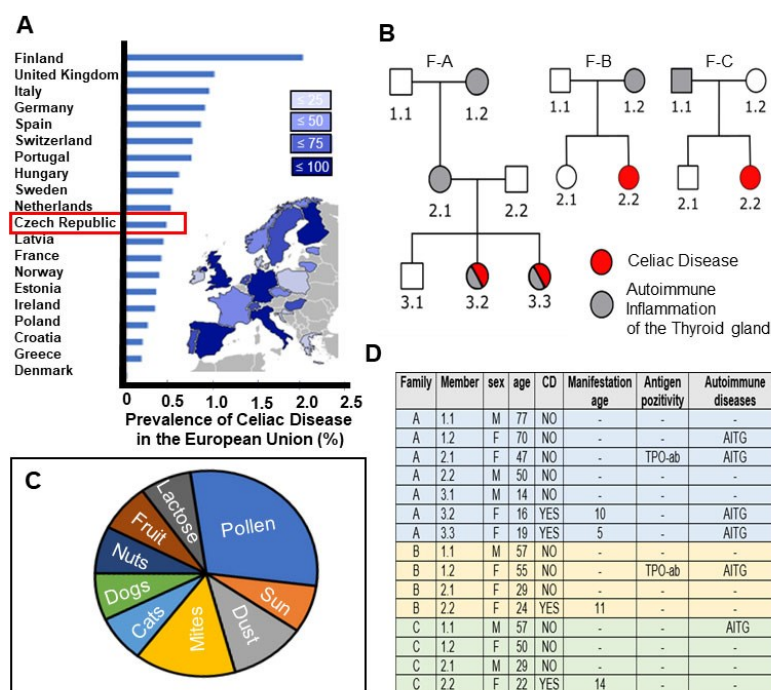


**Figure 1.** High prevalence of CeD in the Czech Republic with study participants representing autoimmune disease susceptibility across familial generations. (A) Horizontal histograms representing the percentage prevalence of CeD in various European countries. Data sourced from WGO (<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines>; Access date: 12/06/2021) with modifications [20]. Inset map of European countries showing the occurrence of CeD per their respective total populations. (B) Pedigree overview of three families (left: F-A; middle: F-B; right: F-C) whose members participated in this study. Individuals affected by CeD (red), autoimmune inflammation of the thyroid gland (grey), both CeD and autoimmune inflammation of the thyroid gland (red-grey) or non-affected controls (white). (C) Pie chart depicting the types of allergens afflicting the study participants. (D) Table summarizing the sex, age, CeD occurrence and manifestation age in family members participating in this study. Antigen positivity to gliadin or autoimmune inflammation of the thyroid gland (AITG) in some family members were indicated. Two participants elicited antigen positivity towards thyroid peroxidase antibody (TPO-ab).

## 2.2. Differential Expression of Transmembrane Markers Indicates Monocytes Extracted from CeD Patients Have the Ability to Transform into Dendritic Cells After Exposure to LPS/PTG.

Monocytes, the largest leukocyte type, are spherical in shape (Figure 2A upper) with prominent surface protrusions upon differentiation with LPS/PTG to dendritic cells (Figure 2A lower). The frequencies of lymphocytes, monocytes and dendritic cells in PBMCs from healthy individuals were expected to be in the range of 70–90%, 10–20% and 1–2%, respectively [21]. Monocytes isolated from PBMCs from CeD individuals were almost within the published range ( $9 \pm 3\%$ ; Figure 2B and 2C upper), while healthy controls (CTL) were slightly outside it ( $5 \pm 1\%$ ; Figure 2C upper). However, differences in monocyte yield arose between Group 1 and 3 (Figure 2C upper) as seen when CTL were compared to CeD ( $p = 0.0357$ ) as determined by size and granularity (forward versus side scatter) flow cytometric plot distribution profiles. Individuals with thyroid hormone imbalance (Group 2) showed a  $4.5 \pm 1\%$  monocyte yield, which differed significantly from CeD ( $p = 0.028$ ) but not when compared to CTLs ( $p = 0.267$ ) (data not shown). Gating strategies indicated monocytes have the ability to transform into MoDCs in CTL and especially CeD groups ( $41 \pm 3\%$ ; Figure 2C lower, Supplementary Figure 2, 3 and 4) after exposure to LPS/PTG for 1 day. Monocytes derived from CeD patients had a significantly higher ability to transform into MoDCs when compared to the CTLs, with an approx. 4.2-fold

increase in percentage proportion of MoDCs ( $p = 0.00083$ , Figure 2C lower). Likewise, the percentage proportion of CeD MoDCs differed significantly from individuals with thyroid hormone imbalance (6.5-fold increase,  $p = 0.011$ ), which showed similar levels to CTLs ( $p = 0.412$ , data not shown).

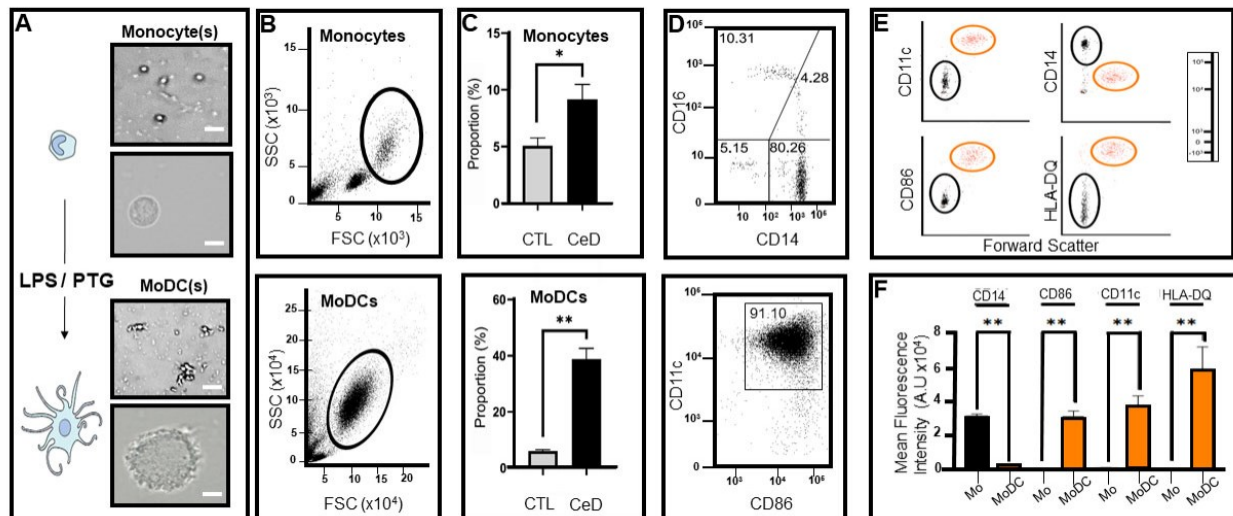


**Figure 2.** Differential expression of transmembrane markers indicates monocytes extracted from CeD patients have the ability to transform into dendritic cells after exposure to gliadin and lipopolysaccharide. (A) Representative schematic (left) and light microscope images of monocytes (right, upper) extracted from CeD peripheral mononuclear cells (PBMCs). Following exposure to lipopolysaccharide (LPS) or peptic-tryptic-gliadin (PTG) fragments, monocytes differentiated into monocyte-derived dendritic cells (MoDCs; Schematic (left), representative images (right, lower)). Images taken at 10 $\times$  magnification; scale bar 100  $\mu$ m. Inset images acquired at 40 $\times$  magnification; scale bar 25  $\mu$ m. (B) Dot plots indicating side scatter (SSC) versus forward scatter (FSC) profiles for CeD monocytes (upper) or MoDCs (lower). Gating demarcates the percentage recovery of monocytes from peripheral mononuclear cells (upper) or transformation efficiency to MoDCs post 24 hr exposure to LPS/PTG (lower). (C) Histograms showing the significant difference in the proportional percentage of monocytes extracted from PBMCs (upper) and transformed MoDCs (lower) from healthy controls (CTL) and celiac disease patients (CeD). Asterisk (\*) or asterisks (\*\*) represent statistical significance at  $p < 0.05$  or  $p < 0.005$  respectively. (D) Representative dot plot showing predominance of CD14 $^{+}$ , CD16 $^{-}$  monocytes in CeD PBMCs (upper) or CD11c $^{+}$ , CD86 $^{+}$  MoDCs (lower). Numbers indicate percentage of CD16 $^{+}$  and/or CD14 $^{+}$  surface markers on monocytes (upper) or CD11c $^{+}$ , CD86 $^{+}$  MoDCs (lower), respectively. (E) Forward scatter dot plots of monocytes (black gate) or MoDCs (orange gate) differentially expressing surface markers CD14, CD86, CD11c or HLA-DQ. Logarithmic scale provided (right). (F) Histograms showing significant difference in the mean fluorescence intensity for CD14, CD86, CD11c or HLA-DQ between monocytes (Mo) and MoDCs. Asterisks (\*\*) represent statistical significance at  $p < 0.005$ .

Monocytes were characterised as classical, intermediate and non-classical via profiling of surface marker expression (Figure 2D upper). Results showed that  $80.26 \pm 3\%$  were CD14 $^{+}$  CD16 $^{-}$  classical monocytes in CeD patients. In this patient group,  $4.28 \pm 2\%$  were CD16 $^{+}$  CD14 $^{+}$  intermediate monocytes and  $10.31 \pm 1\%$  CD16 $^{+}$  CD14 $^{-}$  non-classical monocytes, while  $5.15 \pm 0.5\%$  of cells were negative for both CD16 and CD14 and as such, were not characterised. No statistically significant difference was observed between CTL and CeD groups when monocyte subpopulations were compared (classical monocytes CD14 $^{+}$ CD16 $^{-}$  ( $p = 0.4121$ ), intermediate CD14 $^{+}$ CD16 $^{+}$  ( $p = 0.3152$ ) and non-classical CD14 $^{-}$ CD16 $^{+}$  ( $p = 0.3152$ )). It should be noted that monocyte subsets are not homogeneous populations with underlying distinct transcriptional cellular profiles [22]. While the emphasis was placed on CD14 $^{+}$  expressing monocytes given their prominence in this cell type, classical, intermediate and non-classical categories were not deliberately separated prior to MoDC transformation for this study.

MoDCs from CTL and CeD were predominantly CD11c $^{+}$ CD86 $^{+}$  according to gating demarcation ( $91 \pm 4\%$ ) (Figure 2D lower). Surface marker CD14, CD86, CD11c and HLA-

DQ profiling altered significantly during the transformation of CeD monocytes to MoDCs, as can be seen in the forward scatter patterns (Figure 2E and F). Mean fluorescence intensity values for CD14 were 15-fold higher in CeD monocytes compared to MoDCs ( $p = 0.00001$ ). In contrast, CD86, CD11c and HLA-DQ levels were 56, 30 and 428-fold higher, respectively, in MoDCs in comparison to CeD monocytes (CD86,  $p = 0.00024$ ; CD11c,  $p = 0.00055$ ; HLA-DQ,  $p = 0.00133$ ).

### 2.3. Identification of a Novel CD33:CD64 Bio-Profile Marker for CeD Patients.

The transmembrane receptor CD33 is expressed on cells derived from the bone marrow of myeloid lineage [23]. CD64 is an integral membrane glycoprotein and is constitutively only found on monocytes and macrophages [24]. Following selection for CD14<sup>++</sup> expression (see above), monocytes from CeD patients were analysed for their expression of CD33 and CD64. There is no statistically significant difference in the expression of CD33 ( $p = 0.4020$ ) and CD64 ( $p = 0.3650$ ) in CD14<sup>++</sup> monocytes in CTLs. However, findings revealed that CD14<sup>++</sup> monocytes from CeD patients have significantly higher levels of CD64 expression ( $p = 0.0352$ ) than CTL along with lower CD33 expression when similarly compared ( $p = 0.0029$ ). While CD33 and CD64 had similar levels in CTL (approx.  $10^4$ /mL blood), intriguingly, CD33 and CD64 showed a highly significant inverse profile in this study ( $p = 0.00012$ ; Figure 3A right). This finding highlights a novel CeD bio-profile marker that could be exploited for diagnostic purposes.

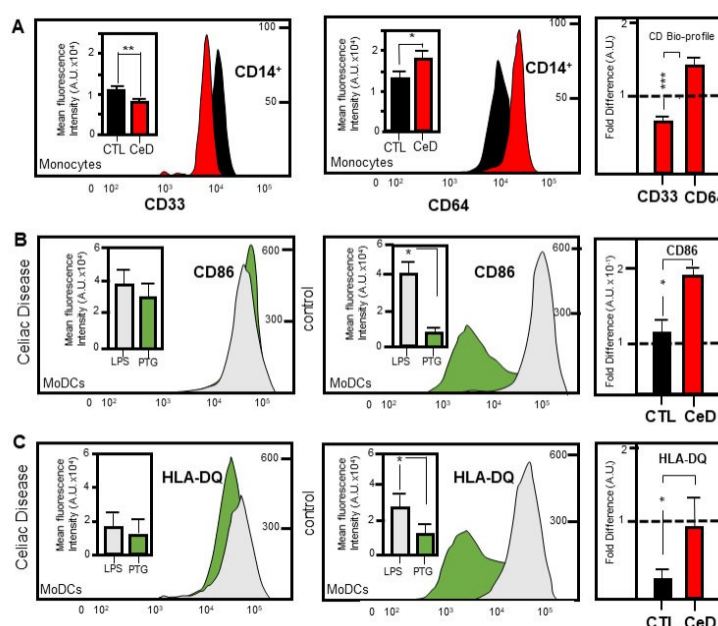


**Figure 3.** CeD defined by the identification of a novel bio-profile marker CD33 CD64<sup>++</sup> and hypersensitivity to gliadin activation. **(A)** Curved flow cytometric histograms (CFCH) reveal the lower or higher expression of CD14<sup>++</sup> monocyte surface markers CD33 (left) or CD64 (middle), respectively, in CeD patients versus healthy controls (CTL). Insets represent the mean fluorescence intensities as arbitrary units (A.U.) for the combined CD33: CD14<sup>++</sup> (left) or CD64: CD14<sup>++</sup> profile for CTL versus CeDs. Percentage scale bar shown. Histograms represent the highly significant fold difference between CD33 and CD64 levels in CeD patients when normalised to those found in CTL (dashed line). Asterisks (\*, \*\* or \*\*\*) represent statistical significance at  $p < 0.05$ ,  $p < 0.005$  or  $p < 0.0005$  respectively. **(B, C)** CFCH and insets show expression of MoDC surface marker CD86 **(B)** or HLA-DQ **(C)** to gliadin (green) compared to LPS (grey) in CeD (left) versus CTL (middle). Scale represents cellular population levels or mean fluorescence intensity A.U. Histograms underscore the highly significant increased sensitivity of CeD (red) versus CTL (black) to gliadin activation (right). Asterisk (\*) represent statistical significance at  $p < 0.05$ .

#### 2.4. MoDCs from CeD Patients Exhibit Hypersensitivity to Gliadin Activation

The type I transmembrane integrin alpha chain protein, CD11c, is found at high levels on dendritic cells [25]. This marker was chosen as a positive selection marker of CeD or CTL monocyte differentiation. Likewise, CD86 acted as an indicator of MoDC maturation [26]. In response to LPS/PTG stimulation, CD11c+ MoDCs originating from CeD patients revealed a higher proportion of CD86 expression in comparison to CTL samples (Figure 3B and Supplementary Figure S5). Significant fold differences were noted when levels were relatively compared against a normalised LPS background (0.7-fold increase,  $p = 0.0476$ ; Figure 3B right). CD11c+ MoDCs were further assessed for their expression of the HLA-DQ surface marker after LPS or PTG. Similar HLA-DQ stimulation profiles were found following exposure to LPS or PTG in CD11c+ MoDCs originating from CeD patients ( $p = 0.625$ ; Figure 3C and Supplementary Figure S5). This contrasted with the lower HLA-DQ levels in CD11c+ MoDCs originating from CTL when exposed to PTG fragments in comparison to LPS stimulation ( $p = 0.046$ ; Figure 3C middle). When compared as indicated above, significantly increased HLA-DQ fold differences were revealed in CD11c+ MoDCs originating from CeD patients versus CTL when levels were relatively compared against a normalised LPS background (2.2-fold increase,  $p = 0.0179$ ; Figure 3C right). Elevated CD86 and HLA-DQ expression in CD11c+ MoDCs to PTG exposure highlights the hypersensitivity of CeD patients to this stimulant in contrast to the general homeostatic response.

#### 2.5. Superior CD86 Presentation in MoDCs from CeD Patients Compared to CTL.

The intracellular distribution of the MoDC maturation indicator CD86 was sought, given the evidence reported above that CeD is characterised by its elevated levels upon gliadin fragment exposure. Confocal microscopic analysis revealed the predominance of CD86 accumulating within the MoDC cellular membrane in CeD samples (Figure 4A) in comparison to CTLs (Figure 4B). Results showed a very significant increase (0.6-fold elevation;  $p = 0.0037$ , Figure 4C and 4D) in fluorescence intensity signal corresponding to CD86 at the membrane in CeD samples. In contrast, CD86 appeared to be confined to the cytosol in MoDCs originating from healthy control individuals (Figure 4B). Similar CD86 cytosolic expression levels ( $p = 0.381$ ) were noted for both CeD and CTL groups (Figure 4E). This supports previous findings with diabetic patients highlighting that mature MoDCs upregulate the synthesis of co-stimulatory receptor molecules, such as CD86, during antigen presentation [26].

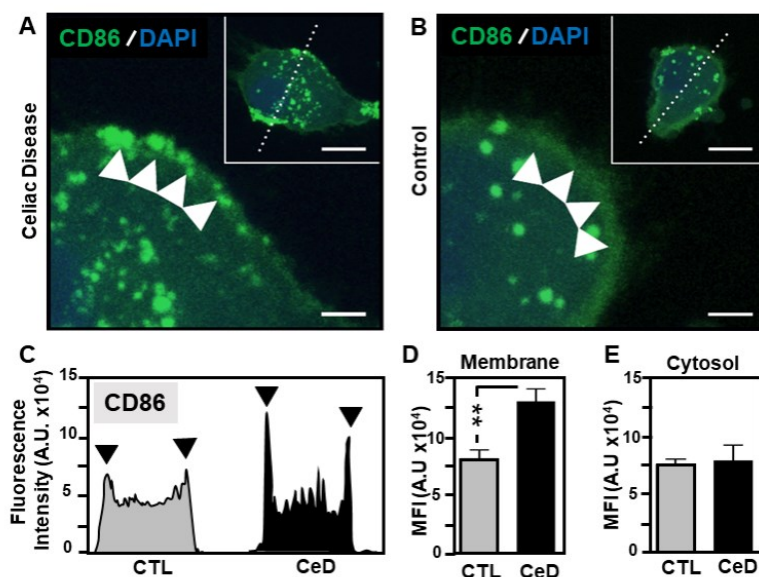


**Figure 4.** Superior CD86 presentation in MoDCs from CeD patients compared to CTL. (A and B) Representative confocal micrographs of CD86 expression in MoDCs originating from CeD (CeD-MoDCs) patients (A) or CTL (B). Note the predominance of CD86 localised to the surface of CeD-MoDCs compared to CTL samples (green, white arrowheads). Scale bar 10  $\mu$ m. Inset showing an overview of an individual MoDC transected (dashed line) for fluorescence intensity profile determination. Scale bar 5  $\mu$ m. Nucleus stained with DAPI (blue). (C) Fluorescence intensity profile of MoDCs transected in insets (A and B). Black arrowheads indicate CD86 detected at the MoDC surface membranes of CeD and control (CTL) samples. (D and E) Histograms showing the mean fluorescence intensity (MFI) as arbitrary units for CD86 in the membrane (D) or cytosolic (E) regions of MoDCs from CeD or CTLs. Asterisks (\*\*) represent statistical significance at  $p < 0.005$ .

#### 2.6. Predominant Membrane-Associated HLA-DQ Expression in MoDCs Originating from CeD Patients Compared to CTL.

HLA-DQ is a cell surface receptor found on antigen-presenting cells [3]. High levels of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 alleles have assisted in identifying CeD patients and individuals at risk of developing this condition [27]. Confocal micrograph assessment of MoDCs from CeD patients strongly supported the sensitivity of HLA-DQ recognition to 24 hr PTG exposure, in contrast to those from CTL individuals. Robust expression of HLA-DQ predominated at the MoDC membrane in CeD samples as seen from the highly significant elevated mean fluorescence intensity profiling in comparison to controls (Figure 5A–C). HLA-DQ revealed a 2.2-fold higher level of membrane associated expression ( $p = 0.00028$ ) in CeD-MoDCs versus CTL-MoDCs (Figure 5D). Furthermore, the presence of HLA-DQ was also very much increased in the cytosol of CeD-MoDCs compared to CTL-MoDCs (1.8-fold upregulation,  $p = 0.0001$ ; Figure 5E). Such findings agree with the known functional characteristics of HLA-DQ receptors [28] in antigen recognition and presentation to CD4<sup>+</sup> T helper-cells to enable activation of the host innate immunity system.

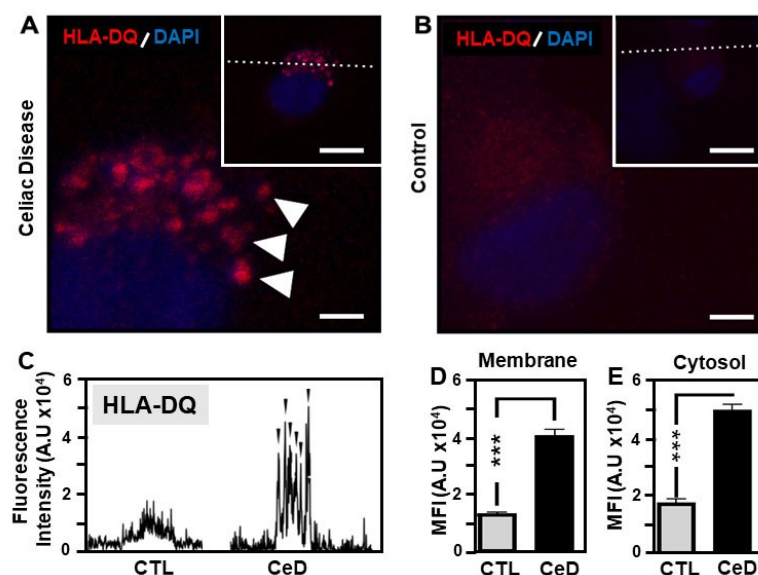


**Figure 5.** Robust HLA-DQ membrane expression in MoDCs from CeD patients compared to CTL. (A and B) Representative confocal micrographs of HLA-DQ expression in MoDCs originating from CeD (CeD-MoDCs) patients (A) or CTL (B). Note the high expression levels of HLA-DQ localised to the surface of CeD-MoDCs compared to CTL samples (red, white arrows). Scale bar 5  $\mu\text{m}$ . Inset showing an overview of an individual MoDC transected (dashed line) for fluorescence intensity profile determination. Scale bar 20  $\mu\text{m}$ . Nucleus stained with DAPI (blue). (C) Fluorescence intensity profile of MoDCs transected in insets (A and B). Black arrowheads indicate HLA-DQ detected at the MoDC surface membranes of CeD and CTL samples. (D and E) Histograms showing the mean fluorescence intensity (MFI) as arbitrary units for HLA-DQ in the membrane (D) or cytosol (E) of MoDCs from CTL or CeD. Asterisks (\*\*\*) represent statistical significance at  $p < 0.0005$ .

### 3. Discussion

This investigation deciphered the cell surface profile of monocytes and their derived dendritic cells in the context of CeD. Focus was placed on the involvement of HLA-DQ and co-stimulatory surface membrane markers due to their recognised association with autoimmunity [29]. The prevalence of CeD in the Czech Republic enabled access to PBMC for *in vitro* model utilisation from three families with a history of autoimmune disease. Differential CD14 CD16 positivity facilitated monocyte identification. Findings revealed substantially greater monocyte yields from CeD patients compared to healthy controls. Further analysis identified a novel bio-profile characterised by elevated CD64 and reduced CD33 levels, unique to the CD14++ monocytes of CeD patients. The greater sensitivity of CeD monocytes to LPS-PTG stimulation was initially seen from the higher proportions of dendritic cells from this source. Elevated CD86, CD11c and HLA-DQ cell surface markers confirmed the efficient transformation of monocytes into mature dendritic cells and empowered the effectiveness of the *in vitro* platform as a CeD model system. In comparison to controls, an increased sensitivity to PTG from CD86 and HLA-DQ readouts was found in MoDCs originating from CeD patients. Delving further into the influence of LPS-PTG stimulation on MoDCs, confocal microscopy demonstrated that the intracellular distribution of CD86 and HLA-DQ predominated at the cellular membrane in CeD, indicative of superior antigen presentation ability.

Despite the advances in CeD detection, its prevalence of 1% within the European Union has only recently been published using a large population cohort [30]. Findings have shown that CeD varies considerably in different European countries, with Finland having the highest prevalence at approx. 2% [30,31]. Recent data estimated the occurrence of CeD in the Czech Republic at 0.3% [20], with others reporting an even greater increase in the condition in that country [32]. The reason for the rise in CeD occurrence is unknown,

although environmental factors linked to hygiene have been suggested [33]. Nevertheless, first-degree relatives (FDR) of individuals with CeD form an especially high-risk group, estimated at 4–17% [34,35]. For FDR homozygous for HLA-DQ2, the chances of developing CeD during early age reaches 26% [36], with second-degree relatives also at increased risk levels, although to a lesser extent [37].

It is acknowledged that current CeD *in vitro* model systems are unable to recapitulate the multifactorial aspects of this complex disorder [38]. Nevertheless, the recently developed strategy for exploiting peripheral blood mononuclear cells that harbour B cells, gluten-reactive T cells, dendritic cells and monocytes offers a valuable avenue for establishing a hierarchy of immunogenic peptides involved in the immune response of CeD individuals. Advantage can be taken of the limited diversity of the pathogenic epitopes as a basis for using gliadin-digested peptide fragments within the CeD *in vitro* model system. Focus has been placed by others on T-cell characterisation from PBMCs with pMHCII tetramers [39]. This technique has identified upregulated CD38 on T cells as a possible biomarker for gluten re-exposure or diagnosis of CeD [40]. Nevertheless, the pMHCII tetramer technique still needs additional PBMC techniques to support its performance [39]. Herein, this study isolated PBMCs from CeD and CTL subjects and focused instead on CD14<sup>++</sup> monocytes and their subsequent transformation to mature monocyte (Mo)-derived dendritic cells (DCs). Flow cytometric profiling and mean fluorescence intensity analysis enabled accurate selection of CD14<sup>++</sup>, CD16 monocytes originating from CeD subjects and CTLs. The efficacy of monocyte transformation to MoDCs upon LPS/PTG stimulation was evident in selective upregulation of CD86, CD11c and HLA-DQ maturation indicator markers. Importantly, this study identified a novel CeD bio-profile represented by the inverse relationship between CD33 and CD64 surface markers in CD14<sup>++</sup> monocytes originating from CeD patients. Through the careful decipherment of flow cytometric readouts, reduced CD33 levels were associated with elevated levels of the co-stimulatory partner CD64. The significance of this finding needs further elucidation given that CD33 represents a lineage marker associated with phagocytotic inhibition [41,42] and CD64 is an early onset marker of clinical infection [43]. Nevertheless, it may be of potential diagnostic and therapeutic value for CeD remediation.

Over-sensitivity of MoDCs to gliadin was revealed from increased expression of CD86 following normalisation to LPS, indicative of pro-inflammatory pathway activation in CeD versus CTLs [44]. Others have noted that CD11c<sup>+</sup> dendritic cells accumulated in the celiac lesion and revealed an activated phenotype expressing CD86 [45], considered one of the key molecules involved in the co-stimulation of T cells [46]. CeD demonstrates very strong HLA association, higher than that seen in many other auto-immune diseases such as type I diabetes or rheumatoid arthritis [47]. While the response was lower than that elicited by LPS in this CeD *in vitro* model, this study showed the elevated expression of HLA-DQ in MoDCs originating from CeD subjects compared to CTLs, indicative of the increased sensitivity to gliadin activation.

Confocal microscopy and analysis provided evidence demonstrating the predominance of CD86 and HLA-DQ at the surface membrane of MoDCs originating from CeD patients. Comparative mean fluorescence levels were noted for CD86 cytosolic levels for both CeD and CTL groups. Research by others noted the constitutive expression of CD86 mRNA in mini porcine aortic endothelial cells enabling rapid translation of the CD86 protein on the cell surface following activation, presumably from the stored mRNA [46]. Recently, two alternatively spliced CD86 mRNA variants were identified in resting human monocytes characterized by a deletion of the transmembrane domain (soluble CD86) and extracellular (EC) domain (transmembrane form of CD86), respectively [48]. The implications of the presence of soluble CD86 on CeD aetiology is currently unknown. The robust expression of CD86 at the MoDC membrane after gliadin peptide exposure provides evidence for its role in superior antigen presentation in CeD. In contrast HLA-DQ levels were strongly elevated in both cytosolic and membrane compartments of MoDCs from CeD

versus CTLs. Such data supports the specific association of HLA-DQ with CeD and its recognised presentation ability.

In conclusion, this investigative study interpreted the monocytes and MoDCs of CeD patients with the identification of a novel bio-profile marker for clinical interpretation. Herein, evidence has shown that CD86 and HLA-DQ are reactors to CeD activation, triggering their congregation at the MoDC membrane for efficient antigen presentation. Furthermore, harnessing the attributes of the *in vitro* model with inclusion of highly potent MoDCs will offer robust therapeutic avenues for CeD patients and their future family pedigree.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Clinical Diagnosis of CeD Patients and Pedigree Overview.

CeD was diagnosed in this study population following current diagnosis guideline, *i.e.*, measurement of total serum IgA and IgA antibodies against transglutaminase 2 (TGA-IgA). If TGA-IgA was 2–10 times the upper limit of normal ( $10\times$  ULN), biopsy diagnosis was applied [49]. Written informed consent was obtained from all individuals involved in this study with approval from the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic (approval number G-18–23). A total of 15 participants ( $n = 15$ ) were enrolled in this study and categorised as follows: gluten-free diet (GFD)-treated CeD patients (Group 1:  $n = 4$ ); autoimmune disease patients (Group 2:  $n = 4$ ); normal controls with no known autoimmune disease, inflammation or malignancy (Group 3:  $n = 7$ ). Detailed patient characteristics can be found in Figure 1D. All subjects were Caucasians of European ancestry. In terms of pedigree, Group 1–3 belonged to three families (F-A, F-B and F-C) from the Czech Republic with a history of autoimmune disease. The familial cohorts were structured as follows: Members–7 (F-A), 4 (F-B, F-C); Generations–3 (F-A), 2 (F-B, F-C); and Distinct autoimmune diseases–2 (F-A, F-B, F-C).

##### 4.2. Monocyte Isolation from Peripheral Blood Mononuclear Cells

Peripheral whole blood was acquired from participants (outlined above) by a phlebotomist based in the Department of Medical Genetics of Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ. Following dilution with RPMI 1640 medium (1:1; Sigma-Aldrich, MO, USA.), whole blood was gently layered over Ficoll-Paque in a 1:0.7 ratio (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in a Falcon tube and centrifuged for 30 min at  $400\times g$ , resulting in the formation of distinct layers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were located at the interface of the top and second layers beneath the plasma zone. The plasma layer was removed by pipetting, and PBMCs were transferred to room temperature (RT) complete RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, MO, USA) to remove any remaining platelets. Following centrifugation for 20 min at  $400\times g$ , samples of PBMCs were stained with trypan blue, viewed under a light microscope and counted on a haemocytometer slide. PBMCs ( $10^6$  cells) were cultivated for 2 h in a 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flask (Schoeller Pharma, Prague, Czech Republic) in complete medium (CM) containing RPMI 1640, foetal bovine serum (10 %; Sigma-Aldrich, MO, USA) in the presence of antibiotic-antimycotic solution (1%; Sigma-Aldrich, MO, USA) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The non-adherent fraction was then removed following washing with CM.

##### 4.3. Generation of Monocyte Derived Dendritic Cells (MoDCs)

Adherent monocytes were cultivated in CM1 (CM with inclusion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor human (GM-CSF) (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.) and human interleukin-4 (IL-4) (200 ng/mL; Sigma-Aldrich, MO, USA)) for 6 days. Generated MoDCs (CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>) were harvested manually with a cell scraper, centrifuged for 5 min at  $400\times g$ , resuspended in CM1 and divided into 6-well plates (Schoeller Pharma, Prague, Czech Republic). Gliadin (Sigma-Aldrich, MO, USA)

was fractionated by pepsin-trypsin digestion as follows: gliadin (100 mg/mL) and pepsin (2 mg/mL; Sigma-Aldrich, MO, USA) were dissolved in 0.2 N HCl (Sigma-Aldrich, MO, USA) and incubated for 2 h at 37 °C with pH adjustment to 7.4 before addition of trypsin (2 mg/mL). The solution was incubated for 4 h at 37 °C with rotation at 250 rpm. The enzymatic reaction was stopped by incubation for 30 min at 100 °C. Peptic-tryptic-gliadin (PTG) fragments were divided into aliquots and frozen at −20 °C. PTG (1 mg/mL) and lipopolysaccharides (LPS) (100 ng/mL; Sigma-Aldrich, MO, USA) were added to cells for 24 h to induce MoDC maturation.

#### 4.4. Flow Cytometry and FACS Staining

After 24 h stimulation by LPS/PTG, MoDCs were manually removed using a cell scraper, briefly centrifuged at 400× g and resuspended in 100 µL RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, MO, USA) with monoclonal antibodies (see below) added according to manufacturer's recommendation, and incubated for 20 min at 4 °C in the dark. The following anti-human monoclonal antibodies (EXBIO, Prague, Czech Republic) were used: PE-conjugated CD86 (clone BU63), FITC-conjugated CD14 (clone MEM-15), PerCP-conjugated CD16 (clone 3G8), APC-conjugated CD33 (clone WM53), PerCP-conjugated CD11c (clone BU15), PE-conjugated CD64 (clone 10.1) and APC-conjugated HLA-DQ (clone SK10, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). An additional wash was performed after incubation. MoDCs were resuspended in cold PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) with analysis performed on a BD FACSVerser flow cytometer (BD Biosciences, CA, USA). Data were analysed with BD FACSuite™ Software. All images and graphs were generated and assembled using GraphPad PRISM v3.0 and Inkscape v1.0.1.

#### 4.5. Immunohistochemical and Confocal Microscopy Detection of MoDC Surface Antigens.

MoDCs were cultivated as outlined above on glass coverslips. After 24 h stimulation by LPS/PTG, growth medium was removed and MoDCs were 2 times for 5 min with PBS. These cells were exposed to 4 % paraformaldehyde for 15 min by way of fixation, followed by washing for 5 min with PBS. Cells were then permeabilized in 1× TBST (1× TBS including 0.5% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich MO, USA)) for 1 hr. Following one wash for 5 min in 1× TBS, MoDCs were placed in blocking solution (1× TBS containing 5 % bovine serum albumin and 0.5% Triton™ X-100) for 1 h at RT. These cells were then exposed to PE-conjugated anti-CD86 (1:100 in blocking solution; details above) or APC-conjugated anti- HLA-DQ (1:100 in blocking solution; details above) with 2 h incubation at 4 °C. Samples were washed 3 times for 15 min in 1× TBST and air-dried in the dark. To prepare for microscopy, MoDCs grown on coverslips were mounted in ProLong® Gold Antifade reagent (Cell Signalling Technology, MA, USA.; cat. # 89615) containing DAPI and placed on glass slides. Microscopic images were acquired as single XY planes with the pinhole set to Airy1 on an inverted confocal laser scanning microscope Leica TCS SP5 (DMI6000, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) using an HCX PL APO 30×/1.30 Oil objective. Images were analysed in LAS AF software (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) and ImageJ v1.53e software (NIH, WA, USA). All images and graphs were generated and assembled in figures using GraphPad PRISM v3.0 and Inkscape v1.0.1.

#### 4.6. Statistical Analysis

Data comparison was performed using nonparametric, one-tailed Mann–Whitney U test, two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed rank test or Student's *t*-test using GraphPad PRISM 3.0 or Microsoft Excel. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22189982/s1](http://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22189982/s1)

**Author Contributions:** Conceptualization, M.H. and M.Č.; Data curation, M.H., K.R., V.K. and J.P.; Formal analysis, M.H.; Methodology, K.R.; Project administration, M.H.; Supervision, M.Č.;

Visualization, M.H. and V.B.O.; Writing—original draft, M.H. and V.B.O.; Writing—review & editing, M.H. and V.B.O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Charles University research program PROGRES Q 36 - Metabolism, and 260531/SVV/2020: Multidisciplinary research of the regulation mechanisms of human metabolism.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic (date of approval: 13/06/2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Lundin, K.E.; Wijmenga, C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *12*, 507–515.
2. Shiina, T.; Hosomichi, K.; Inoko, H. and Kulski, J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J. Hum. Genet.* **2009**, *54*, 15–39.
3. Zajacova, M.; Kotrbova-Kozak, A.; Cerna, M. HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 genotyping of 180 Czech individuals from the Czech Republic pop 3. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 365–366.
4. Lebowitz, B.; Sanders, D.S.; Green, P.H.R. Coeliac disease. *Lancet* **2018**, *391*, 70–81.
5. Maki, M.; Collin, P. Coeliac disease. *Lancet* **1997**, *349*, 1755–1759.
6. Marsh, M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* **1992**, *102*, 330–354.
7. Sollid, L.M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 647–655.
8. Shan, L.; Molberg, O.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G.M.; Sollid, L.M.; Khosla, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **2002**, *297*, 2275–2279.
9. Matysiak-Budnik, T.; Moura, I.C.; Arcos-Fajardo, M.; Lebreton, C.; Menard, S.; Candall, C.; Ben-Khalifa, K.; Dugave, C.; Tamouza, H.; Van Niel, G.; et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J. Exp. Med.* **2007**, *205*, 143–154, doi:10.1084/jem.20071204.
10. Visser, J.; et al. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: Celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann. Acad. Sci.* **2009**, *1165*, 195–205.
11. Schumann, M.; Siegmund, B.; Schulzke, J.D.; Fromm, M. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *3*, 150–162, doi:10.1016/j.jcmgh.2016.12.006.
12. Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.-J.; Pulendran, B.; Palucka, K. Immunobiology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2000**, *18*, 767–811, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
13. Palová-Jelínková, L.; Rožková, D.; Pecharová, B.; Bártová, J.; Šedivá, A.; Taskalová-Hogenová, H.; Spíšek, R.; Tučková, L. Gliadin Fragments Induce Phenotypic and Functional Maturation of Human Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 7038–7045, doi:10.4049/jimmunol.175.10.7038.
14. Varol, C.; Landsman, L.; Fogg, D.K.; Greenshtein, L.; Gildor, B.; Margalit, R.; Kalchenko, V.; Geissmann, F.; Jung, S. Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **2006**, *204*, 171–180, doi:10.1084/jem.20061011.
15. Yona, S.; Kim, K.-W.; Wolf, Y.; Mildner, A.; Varol, D.; Breker, M.; Strauss-Ayali, D.; Viukov, S.; Williams, M.; Misharin, A.; et al. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **2013**, *38*, 79–91, doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001.
16. Wong, K.L.; Tai, J.J.-Y.; Wong, W.-C.; Han, H.; Sem, X.; Yeap, W.-H.; Kourilsky, P.; Wong, S.-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **2011**, *118*, e16–e31, doi:10.1182/blood-2010-12-326355.
17. Wong, K.L.; Yeap, W.H.; Tai, J.J.-Y.; Ong, S.M.; Dang, T.M.; Wong, S.C. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* **2012**, *53*, 41–57, doi:10.1007/s12026-012-8297-3.
18. Zawada, A.M.; Rogacev, K.S.; Rotter, B.; Winter, P.; Marell, R.-R.; Fliser, D.; Heine, G.H. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* **2011**, *118*, e50–e61, doi:10.1182/blood-2011-01-326827.
19. Cinova, J.; Palová-Jelínková, L.; Smythies, L.E.; Černá, M.; Pecharová, B.; Dvorak, M.; Fruhauf, P.; Taskalová-Hogenová, H.; Smith, P.D.; Tučková, L. Gliadin Peptides Activate Blood Monocytes from Patients with Celiac Disease. *J. Clin. Immunol.* **2007**, *27*, 201–209, doi:10.1007/s10875-006-9061-z.

20. Bai, J.C.; Ciacchi, C. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. *J. Clin. Gastroenterol.* **2017**, *51*, 755–768, doi:10.1097/mcg.0000000000000919.
21. Kleiveland, C.R. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*; Verhoeckx, K., et al. Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; pp. 161–167.
22. Gren, S.T.; Rasmussen, T.B.; Janciauskiene, S.; Håkansson, K.; Gerwien, J.G.; Grip, O. A Single-Cell Gene-Expression Profile Reveals Inter-Cellular Heterogeneity within Human Monocyte Subsets. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0144351, doi:10.1371/journal.pone.0144351.
23. Kenderian, S.; Ruella, M.; Shestova, O.; Klichinsky, M.; Aikawa, V.; Morrisette, J.J.D.; Scholler, J.; Song, D.; Porter, D.L.; Carroll, M.C.; et al. CD33-specific chimeric antigen receptor T cells exhibit potent preclinical activity against human acute myeloid leukemia. *Leuk.* **2015**, *29*, 1637–1647, doi:10.1038/leu.2015.52.
24. Akinrinmade, O.A.; Chetty, S.; Daramola, A.K.; Islam, M.-U.; Thepen, T.; Barth, S. CD64: An Attractive Immunotherapeutic Target for M1-type Macrophage Mediated Chronic Inflammatory Diseases. *Biomed.* **2017**, *5*, 56, doi:10.3390/biomedicines5030056.
25. Corbí, A.L.; Rodríguez, C.L. CD11c Integrin Gene Promoter Activity During Myeloid Differentiation. *Leuk. Lymphoma* **1997**, *25*, 415–425, doi:10.3109/10428199709039028.
26. Mbongue, J.C.; Nieves, H.A.; Torrez, T.W.; Langridge, W.H.R. The Role of Dendritic Cell Maturation in the Induction of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 327, doi:10.3389/fimmu.2017.00327.
27. Thapa, B.R.; Rawal, P.; Sapra, B.; Vaiphei, K.; Nain, C.K.; Singh, K. Familial Prevalence of Celiac Disease. *J. Trop. Pediatr.* **2010**, *57*, 45–50, doi:10.1093/tropej/fmq041.
28. Title Page / List of Contents / Preface; S. Karger AG, 2009; Vol. 26, p. – ;.
29. Taneja, V.; David, C.S. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol. Rev.* **1999**, *169*, 67–79, doi:10.1111/j.1600-065x.1999.tb01307.x.
30. Mustalahti, K.; Catassi, C.; Reunanen, A.; Fabiani, E.; Heier, M.; McMillan, S.; Murray, L.; Metzger, M.H.; Gasparin, M.; Bravi, E.; et al. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Ann. Med.* **2010**, *42*, 587–595, doi:10.3109/07853890.2010.505931.
31. Vilppula, A.; Collin, P.; Mäki, M.; Valve, R.; Luostarinen, M.; Krekelä, I.; Patrikainen, H.; Kaukinen, K. Undetected coeliac disease in the elderly: A biopsy-proven population-based study. *Dig. Liver Dis.* **2008**, *40*, 809–813, doi:10.1016/j.dld.2008.03.013.
32. Sumník, Z.; Koloušková, S.; Cinek, O.; Kotalová, R.; Vavrinec, J.; Snajderová, M. HLA - DQA1\*05-DQB1\*0201 positivity predisposes to coeliac disease in Czech diabetic children. *Acta Paediatr.* **2007**, *89*, 1426–1430, doi:10.1111/j.1651-2227.2000.tb02770.x.
33. Lebowitz, B.; Ludvigsson, J.F.; Green, P.H.R. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ* **2015**, *351*, h4347, doi:10.1136/bmj.h4347.
34. Fasano, A.; Araya, M.; Bhatnagar, S.; Cameron, D.; Catassi, C.; Dirks, M.; Mearin, M.; Ortigosa, L.; Phillips, A. Federation of International Societies of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Consensus Report on Celiac Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2008**, *47*, 214–219, doi:10.1097/mpg.0b013e318181afed.
35. Biagi, F.; Campanella, J.; Bianchi, P.; Zanellati, G.; Capriglione, I.; Klersy, C.; Corazza, G.R. The incidence of coeliac disease in adult first degree relatives. *Dig. Liver Dis.* **2008**, *40*, 97–100, doi:10.1016/j.dld.2007.10.004.
36. Lionetti, E.; Castellana, S.; Francavilla, R.; Pulvirenti, A.; Tonutti, E.; Amarri, S.; Barbato, M.; Barbera, C.; Barera, G.; Bellantoni, A.; et al. Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1295–1303, doi:10.1056/nejmoa1400697.
37. Fasano, A.; E A Attwood, S.; Lewis, C.J.; Bronder, C.S.; Morris, C.D.; Armstrong, G.R.; Whittam, J. European and North American populations should be screened for coeliac disease. *Gut* **2003**, *52*, 168–169, doi:10.1136/gut.52.2.168.
38. Moerkens, R.; Mooiweer, J.; Withoff, S.; Wijmenga, C. Celiac disease-on-chip: Modeling a multifactorial disease in vitro. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2019**, *7*, 467–476, doi:10.1177/2050640619836057.
39. Kurki, A.; Kempainen, E.; Laurikka, P.; Kaukinen, K.; Lindfors, K. The use of peripheral blood mononuclear cells in celiac disease diagnosis and treatment. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *15*, 305–316, doi:10.1080/17474124.2021.1850262.
40. du Pré, F.M.; A van Berkel, L.; Ráki, M.; A van Leeuwen, M.; de Ruiter, L.F.; Broere, F.; ter Borg, M.N.D.; E Lund, F.; Escher, J.C.; E A Lundin, K.; et al. CD62LnegCD38+ Expression on Circulating CD4+ T Cells Identifies Mucosally Differentiated Cells in Protein Fed Mice and in Human Celiac Disease Patients and Controls. *Am. J. Gastroenterol.* **2011**, *106*, 1147–1159, doi:10.1038/ajg.2011.24.
41. Butler, C.A.; Popescu, A.S.; Kitchener, E.J.A.; Allendorf, D.H.; Puigdemívol, M.; Brown, G.C. Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation. *J. Neurochem.* **2021**, *158*, 621–639, doi:10.1111/jnc.15327.
42. Bhattacharjee, A.; Jung, J.; Zia, S.; Ho, M.; Eskandari-Sedighi, G.; Laurent, C.D.S.; McCord, K.A.; Bains, A.; Sidhu, G.; Sarkar, S.; et al. The CD33 short isoform is a gain-of-function variant that enhances Aβ1–42 phagocytosis in microglia. *Mol. Neurodegener.* **2021**, *16*, 1–22, doi:10.1186/s13024-021-00443-6.
43. Ng, P.C.; Li, G.; Chui, K.M.; Chu, W.C.W.; Li, K.; O Wong, R.P.; Chik, K.W.; Wong, E.; Fok, T.F. Neutrophil CD64 Is a Sensitive Diagnostic Marker for Early-Onset Neonatal Infection. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 796–803, doi:10.1203/01.pdr.0000142586.47798.5e.
44. Azeem, W.; Bakke, R.M.; Appel, S.; Øyan, A.M.; Kalland, K.-H. Dual Pro- and Anti-Inflammatory Features of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 438, doi:10.3389/fimmu.2020.00438.

45. Ráki, M.; Tollefsen, S.; Molberg, Øyvind; Lundin, K.E.; Sollid, L.M.; Jahnsen, F.L. A Unique Dendritic Cell Subset Accumulates in the Celiac Lesion and Efficiently Activates Gluten-Reactive T Cells. *Gastroenterol.* **2006**, *131*, 428–438, doi:10.1053/j.gastro.2006.06.002.
46. Choi, I.; Cho, B.; Kim, S.D.; Park, D.; Kim, J.Y.; Park, C.-G.; Chung, O.H.; Hwang, W.S.; Lee, J.S.; Ahn, C. Molecular cloning, expression and functional characterization of miniature swine CD86. *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 480–486, doi:10.1016/j.molimm.2005.02.016.
47. Thorsby, E.; Lie, B.A. HLA associated genetic predisposition to autoimmune diseases: Genes involved and possible mechanisms. *Transpl. Immunol.* **2005**, *14*, 175–182, doi:10.1016/j.trim.2005.03.021.
48. Jeannin, P.; Magistrelli, G.; Aubry, J.-P.; Caron, G.; Gauchat, J.-F.; Renno, T.; Herbault, N.; Goetsch, L.; Blaecke, A.; Dietrich, P.-Y.; et al. Soluble CD86 Is a Costimulatory Molecule for Human T Lymphocytes. *Immun.* **2000**, *13*, 303–312, doi:10.1016/s1074-7613(00)00030-3
49. Husby, S.; Koletzko, S.; Korponay-Szabó, I.; Kurppa, K.; Mearin, M.L.; Ribes-Koninckx, C.; Shamir, R.; Troncone, R.; Auricchio, R.; Castillejo, G.; et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2020**, *70*, 141–156, doi:10.1097/mpg.0000000000002497.

## **Příloha II.**

Enhanced Extracellular Transfer of HLA-DQ Activates CD3<sup>+</sup> Lymphocytes towards  
Compromised Treg Induction in Celiac Disease

M. Hudec, I. Juříčková I, K. Riegerová, S. V. Ovsepian, M. Černá, V. B. O'Leary.

International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(11):6102.



Article

# Enhanced Extracellular Transfer of HLA-DQ Activates CD3<sup>+</sup> Lymphocytes towards Compromised Treg Induction in Celiac Disease

Michael Hudec <sup>1,\*</sup> , Iva Juříčková <sup>1</sup>, Kamila Riegerová <sup>2</sup>, Saak V. Ovsepian <sup>3</sup> , Marie Černá <sup>1</sup>   
and Valerie Brid O'Leary <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Genetics, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 10000 Prague, Czech Republic; iva.jurickova@lf3.cuni.cz (I.J.); marie.cerna@lf3.cuni.cz (M.Č.); valerie.oleary@lf3.cuni.cz (V.B.O.)

<sup>2</sup> Department of Immunology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Ruská 87, 10000 Prague, Czech Republic; kamila.riegerova@lf3.cuni.cz

<sup>3</sup> Faculty of Engineering and Science, University of Greenwich London, Chatham Maritime, Kent ME4 4TB, UK; s.v.ovsepian@greenwich.ac.uk

\* Correspondence: michael.hudec@lf3.cuni.cz

**Abstract:** Celiac disease (CeD) manifests with autoimmune intestinal inflammation from gluten and genetic predisposition linked to human leukocyte antigen class-II (HLA-II) gene variants. Antigen-presenting cells facilitate gluten exposition through the interaction of their surface major histocompatibility complex (MHC) with the T cell receptor (TCR) on T lymphocytes. This fundamental mechanism of adaptive immunity has broadened upon recognition of extracellular exosomal MHC, raising awareness of an alternative means for antigen presentation. This study demonstrates that conditioned growth media (CGM) previously exposed to monocyte-derived dendritic cells from CeD significantly downregulates the CD3<sup>+</sup> lineage marker of control T cells. Such increased activation was reflected in their elevated IL-2 secretion. Exosome localization motif identification and quantification within HLA-DQA1 and HLA-DQB1 transcripts highlighted their significant prevalence within HLA-DQB1 alleles associated with CeD susceptibility. Flow cytometry revealed the strong correlation between HLA-DQ and the CD63 exosomal marker in T cells exposed to CGM from MoDCs sourced from CeD patients. This resulted in lower concentrations of CD25<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> T cells, suggestive of their compromised induction to T-regulatory cells associated with CeD homeostasis. This foremost comparative study deciphered the genomic basis and extracellular exosomal effects of HLA transfer on T lymphocytes in the context of CeD, offering greater insight into this auto-immune disease.

**Keywords:** exosome; major histocompatibility complex II; autoimmunity; monocyte-derived dendritic cells; gluten



**Citation:** Hudec, M.; Juříčková, I.; Riegerová, K.; Ovsepian, S.V.; Černá, M.; O'Leary, V.B. Enhanced Extracellular Transfer of HLA-DQ Activates CD3<sup>+</sup> Lymphocytes towards Compromised Treg Induction in Celiac Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6102. <https://doi.org/10.3390/ijms23116102>

Academic Editors: Ramkumar Menon and Krzysztof Bryniarski

Received: 27 April 2022

Accepted: 27 May 2022

Published: 29 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Celiac disease (CeD) is a chronic autoimmune disorder of the small intestine with etiological symptoms manifesting as fatigue, weight loss, anemia, nausea, constipation or diarrhea [1]. Pathology includes villous atrophy, crypt hyperplasia, inflammatory cell infiltration and activation [2]. CeD develops upon the ingestion of gluten, a structural wheat protein also found in barley, rye and oats [3]. Gluten is incompletely cleaved into short peptides by gastric, pancreatic and brush border enzymes that are presented in proximity to the lamina propria of the small intestine, eliciting the basis of the CeD auto-immune response [4–7]. Affecting 1–2% of Caucasian populations, CeD is prompted by familial inheritance predisposition to auto-immunity [8] and selective genotypic status involving human leukocyte antigen (HLA) class-II DQ2 (DQA1 \*05:01/DQB1 \*02:01) and DQ8 (DQA1 \*03:01/DQB1 \*03:02) alleles [9–12].

The HLA class-II (HLA-II) heterodimeric surface molecule or major histocompatibility complex (MHC) is expressed on macrophages, B-lymphocytes and monocyte-derived dendritic cells (MoDCs), qualifying their professional antigen-presenting cell (APC) status [13]. In CeD, gluten peptides are presented by APCs through HLA-DQ, enabling the direct interaction with the T cell receptor (TCR) of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, eliciting a proinflammatory cytokine-rich microenvironment [14–16]. This conventional mechanism of direct interaction between APC and T cells via the MHC-TCR bridge in healthy individuals has evolved with the recognition of a potential role for extracellular exosomes in this process, especially in the context of CeD autoimmunity. Exosomes hold a variety of cargo, but, importantly, they can also present antigens by harboring HLA class-II molecules enabling the activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [17–19]. MoDCs release extracellular exosomes [18,20–22], instigating an immuno-inhibitory or -stimulatory function, contingent with donor status [23].

A subpopulation of T-regulatory cells (Tregs) originates from conventional CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, following induction by antigen recognition and IL-2 cytokine release [24]. Maintaining tissue homeostasis, Tregs are important for the initiation and maintenance of peripheral tolerance in the prevention of excessive immune responses, such as that observed with auto-immunity [25]. While the direct intercellular response of APC and T cells via MHC-TCR has been well characterized [26], the response of Tregs to extracellular exosomes within the context of tolerance loss to gluten remains to be elucidated.

This study serves to decipher the effects of conditioned growth media (CGM) from CeD sourced MoDCs in comparison to healthy controls (CTLs) on T cells. In silico analysis reveals the genomic priming of HLA-DQ alleles associated with CeD risk for exosomal transport. Despite the over-activation of T cells by CeD-sourced exosomes, our findings nevertheless reveal fundamental limitations in Treg transformation capability, shedding light on the basis of this auto-immune condition of the gut.

## 2. Results

### 2.1. T cell Activation upon Direct Contact with MoDCs of CeD Patients Is Circumvented by Exposure to CGM

MHC-TCR engagement binds the MoDC to the T -lymphocyte in the act of antigen presentation. This hallmark mechanism of the adaptive immunity has been exploited through the cultivation and differentiation of CeD and CTL monocytes into MoDCs, as previously reported [10]. The co-cultivation of such MoDCs with T cells enabled the monitoring of viability and intercellular interaction (Figure 1A). Limited proximity within 24 h co-cultivation was evident in contrast to a 2- fold increase in the number of MoDC—T cell contacts recorded (1 0.1 versus 3 0.5 contacts, respectively) between days 3 and 6.

The potential for T cell activation in the absence of MoDCs was determined using CGM derived from the in vitro cultivation of CeD- or CTL-sourced MoDCs, in comparison to naïve growth media with/without LPS. (Figure 1B left). Intriguingly, by cultivation day 6 in cell-free CGM, T cells diversified into two populations represented by CD3<sup>+</sup> upregulated (green; non-activated) or downregulated (orange; activated) expressions (Figure 1B). While T cells were activated by complete media with the inclusion of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CMI; 24 2%), in contrast, a significant 1.7-fold increase in the percentage of CD3<sup>+</sup> T cells was noted following their exposure to CGM derived from CTL—MoDCs (74 2%,  $p = 0.05$ ; Figure 1C). This significant difference was even more evident with 90 1% of T cells in an activation state when cultivated for 6 days in CGM derived from CeD MoDCs ( $p = 0.0003$ ; Figure 1C). It should be noted that competitive binding between HLA-DQ and anti-CD3 may have influenced the result showing the predominance of the CD3 downregulated T cell population. Nevertheless, these findings were supported by their increased IL-2 secretory profile in comparison to non-conditioned stimulated media (i.e., LPS containing CMI;  $p = 0.004$ ) or CTL-CGM ( $p = 0.05$ ) and provided further evidence of their activation (Figure 1D). These results highlight that, while T cells could interact with MoDC, direct contact between these cells of the adaptive immunity is not necessary for T cell stimulation, but rather they can also be activated

via indirect extracellular means. Furthermore, CGM derived from CeD patients held an increased capacity for T cell activation and cytokine secretion.

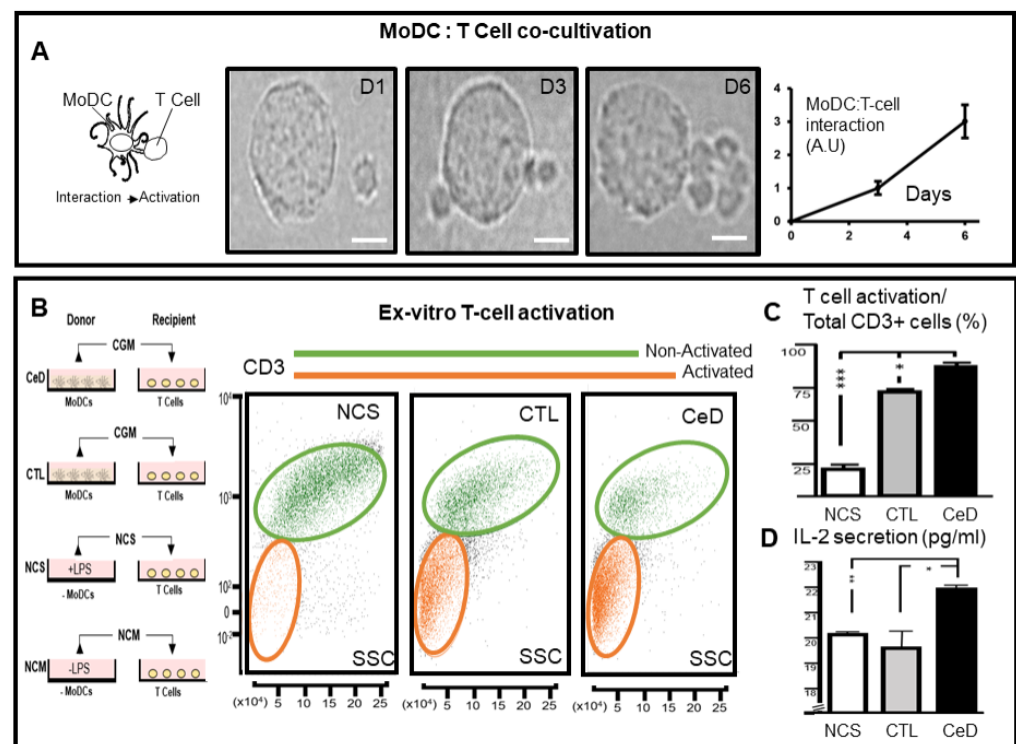


**Figure 1.** T cell activation upon direct interaction with monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) of Celiac disease patients is circumvented by exposure to conditioned growth media. **(A)** Schematic illustration of MoDC interaction with a T cell, which conventionally leads to activation of the latter (left). Representative time-lapse light microscopic images of a MoDC co-cultured with T cells showing no interaction on day 1 (D1) and increasing intercellular interaction between days 3 and 6 (D3; D6, respectively; middle). Scale bar = 5 μm. MoDC:T cell-interaction plot showing increase in intercellular interaction over time (interaction values presented as arbitrary units;  $n = 3$ ; right). **(B)** Illustrative schematic of the experimental overview (left). Monocyte-derived dendritic cells originally sourced from donor Celiac disease patients (CeD) or healthy controls (CTLs), were grown for 6 days in growth medium and transferred (i.e., conditioned growth media—CGM) to T cell recipients isolated from CTLs. Non-conditioned media (NCM) stimulated with LPS (NCS) was also transferred to CTL-T cells. Flow cytometric scatter plot of CD3<sup>+</sup>, a T cell lineage marker versus side scatter (SSC). CD3 is downregulated in recipient T cells exposed to CGM from CTLs and CeD indicative of their activation status (orange line above, orange color gating). T cells exposed to NCS remained non-activated (green line above, green color gating) (middle). **(C)** Histograms of percentage activated T cells per total CD3<sup>+</sup> T cell population (upper) and **(D)** IL-2 secretion post NCS-, CTL- or CeD-CGM exposure for 6 days (right). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 2.2. Higher Prevalence of Exosome Localization Motifs (ELMs) in HLA-DQA1 and HLA-DQB1 Alleles Associated with CeD Risk

Extracellular vesicles from monocyte-derived dendritic cells are enriched in exosomes [27] and have been shown to carry functionally active molecules of HLA class I/II complexed with antigens [28]. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 are located on chromosome 6p21.32 with their respective transcription running in opposite directions within this genomic region (Figure 2A). While both genes contain up to five exons, HLA-DQA1 is larger than HLA-DQB1 by 10,250 bps (Figure 2A). ELMs have been reported within non-coding RNA destined for extracellular transport [29,30]. Given such a background, this study conducted an in-depth investigation of both HLA-DQA1 and HLA-DQB1 loci for the previously reported ELMs [29,30] to ascertain their prevalence and association with CeD-risk alleles.

IPD-MHC database sequences enabled the retrieval of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 protection/risk transcript alleles [31] associated with CeD from exons 1–5 to be scanned for motifs (1—ACCAGCCU; 2—CAGUGAGC; 3—UAAUCCCA). While evidence was found for the single presence of the entire 8 bp ACCAGCCU motif within exon 3 (encoding the HLA extracellular domain) of HLA-DQA1\*01:02 and HLA-DQA1\*01:03, shorter 5 bp versions were more evident within this region for these and other HLA-DQA1 alleles (Figure 2B). These ELMs showed high prevalence within the HLA-DQA1 exon 4 transcript encoding the transmembrane cytoplasmic tail domain in contrast to that found in HLA-DQB1, where they were not found to the same extent. Rather, the HLA-DQB1 leader sequence showed a greater prevalence of truncated CAGUGAGC in comparison to HLA-DQA1. Quantitative data for these truncated ELMs within all protective or risk alleles were combined. The ELMs ACCAG, ACCAGC, ACCAGCC were found to be significantly ( $p = 0.03$ ) more prevalent in HLA-DQB1 alleles associated with CeD risk in comparison to those linked to protection against this condition (Figure 2C). Likewise, CAGUG, CAGUGA, CAGUGAG were also significantly ( $p = 0.02$ ) predominant within HLA-DQB1 alleles associated with CeD risk in contrast to HLA-DQA1 (Figure 2C). To the best of our knowledge, this is the first report of ELM identification within the hallmark HLA-DQA1 and HLA-DQB1 of the adaptive immunity. In addition, these findings highlight the significant higher frequency of ELMs within HLA-DQB1 alleles associated with CeD susceptibility.

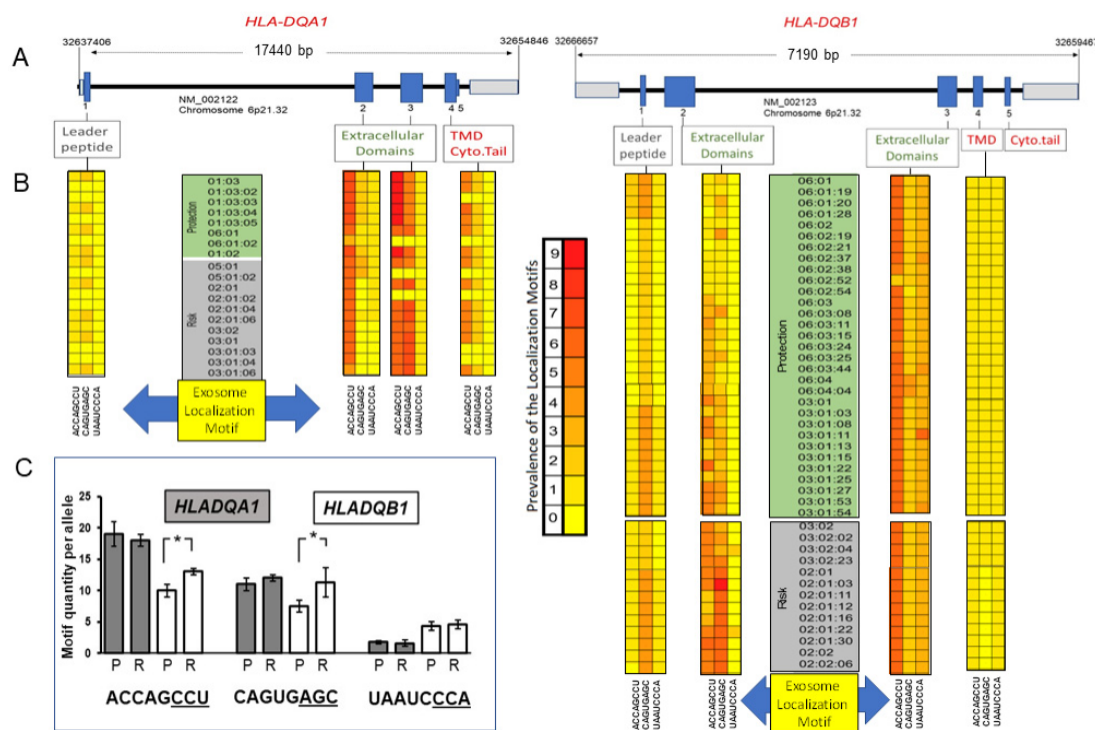


**Figure 2.** Higher prevalence of exosome-targeting sequences in HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles associated with Celiac disease risk. **(A)** Schematic of genomic architecture of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 located on chromosome 6p21.32. Genomic positioning is provided in black numbering marking the 5' and 3' ends (left to right) for each gene. Of note, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 are transcribed in opposite directions. The reference sequence source is indicated under the introns (black) and exons (blue) are indicated as well as 5' and 3' untranslated regions (UTR) (gray). HLA peptide regions translated from exons are shown. **(B)** Heat map of the prevalence of exosomal localization motifs (ELMs) within Celiac disease HLA-DQA1 (left) and HLA-DQB1 (right) protective (green) or risk (gray)-associated alleles. Exosome localization motif sequence shown below. ELM prevalence indicator (center). Zero number represents absence of ELM (pale yellow); numbers 1–9 represent the numerical frequency of the ELM (dark yellow intensifying to red), respectively. **(C)** Histograms representing the

combined ELM quantity per HLA-DQA1 (gray bars) or HLA-DQB1 (white bars) CeD protective (P) or risk (R)-associated alleles. 5 bps represented as ELM with underlined bases. \*  $p < 0.05$ .

### 2.3. Enhanced Exosomal HLA-DQ in T- Cells Exposed to CGM from CeD-Sourced MoDCs

It has been reported that specific HLA alleles predict T cell activation [32]. Given the greater stimulation of CTL T cells to CGM from CeD-MoDCs reported above and the increased risk for CeD associated with exosomal motif prevalence in specific HLA alleles, an examination of exosomal HLA-DQ in activated T cells was conducted. The minor percentage of HLA-DQ associated with exosomes in T cells exposed to CMII (i.e., CMI with, instead, exosome-depleted fetal bovine serum; 1.2–0.3%) can perhaps be explained by a negligible amount of FBS still evident in the GM (Figure 3A, left). Nevertheless, HLA-DQ correlated with the CD63 exosomal marker in 37.4–2% of the CTL T cell population as observed from the scatter plot analysis (Figure 3A, middle) and Western blot detection (Supplementary Figure S1). Confocal micrographs provided evidence for the presence of HLA-DQ within such T cells, in comparison to the naïve experimental group (Figure 3A). A highly significant 0.9-fold increase (71.3–4%;  $p = 0.0002$ ;  $n = 3$ ) was evident in similar T cells post exposure to CGM from CeD-MoDCs (Figure 3A, right). HLA-DQ was also detected by Western blotting of exosomal fractions (Supplementary Figure S1). Likewise, confocal microscopy provided further evidence of an enhanced presence of HLA-DQ in these T cells, compared to the other experimental groups localized to the cytoplasm rather than the nucleus (Figure 3A). Such findings provide evidence that CeD may potentially operate an enhanced HLA-DQ exosomal transportation mechanism compared to healthy CTLs, presumably for antigen presentation to T cells in addition to conventional MHC–TCR complex interaction.

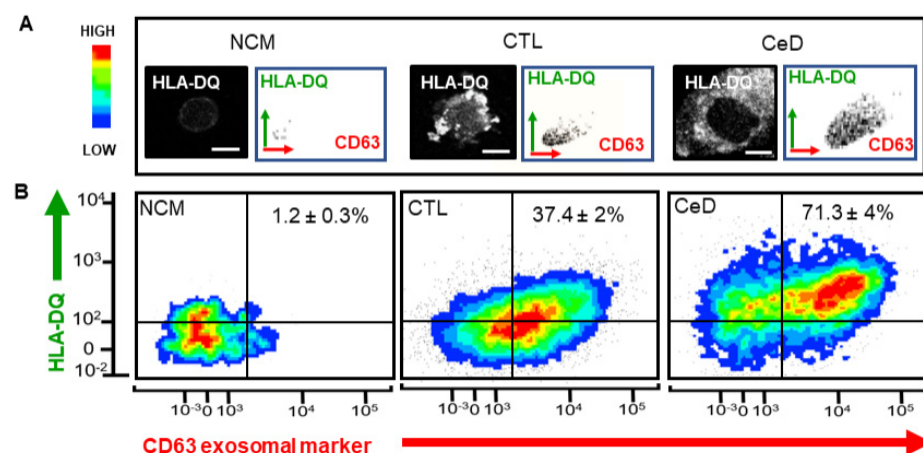


**Figure 3.** Enhanced exosomal HLA-DQ in T cells exposed to conditioned growth media (CGM) from CeD-sourced MoDCs. **(A)** Representative black and white confocal micrographs of HLA-DQ (DQ; white signal) within a T cell exposed to non-conditioned growth media (NCM) or CGM. Scale bar = 10 m. Side scatter (SSC) plots of T cell populations from upper-right-quadrant gating **(B)** demarcating predominant fraction with HLA-DQ within CD63-labeled exosomes. Left: Naïve T cells, i.e., exposure to NCM; middle: T cells exposed to CGM from monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) from healthy individuals—CTL; right: T cells exposed to CGM from MoDCs from CeD patients—CeD. **(B)** Dot blot density cytograms of FITC conjugated HLA-DQ versus APC-conjugated CD63 providing an indication of signal intensity and extent of CD63 exosomal colocalization. The blue/green/yellow/red/hot spots represent increasing numbers of events (low to high) resulting from discrete cell populations. Percentage cell count per total T cell population data shown.

#### 2.4. Compromised T- Cells Induction to Tregs following Exposure to CGM from CeD-Sourced MoDCs

Regulatory T cells (Tregs) are induced in the periphery from naïve T cells, which assist the suppression of immune responses, enabling homeostasis and self-tolerance [33]. Decreased frequency of this Treg sub-lineage T cell population may therefore lead to the development of auto-immune disease [34]. It has been reported that in vitro-induced Tregs can also suppress auto-immune conditions in vivo [35]. Given the differential status of T cell activation after exposure to CGM from CeD compared to CTLs shown above, this study sought to determine the potential Treg presence within these T cell populations using conventional CD25 and CD127 markers [36] (Figure 4). A comparison of the percentage cell counts using area under the curve analysis of curved flow cytometric histograms (CFCHs) indicated a significant 6.26% (2591/41,327 arbitrary units (AU),  $p = 0.029$ ) difference between T cell populations exposed to CTL-CGM compared to CeD-CGM (Figure 4A,B), indicative of the presence of Tregs with expected upregulated CD25 expression (Figure 4B). Although mean fluorescence intensity (MFI) values for CD25 were higher in T cells exposed to CeD-CGM compared to naïve T cells exposed to NGM ( $p = 0.03$ ), the highest values were found following exposure to CTL-CGM ( $p = 0.01$ ) (Figure 4C). The downregulation of CD127 was also more evident within T cells exposed to CTL-CGM, highlighting the presence of Tregs within this population (Figure 4D). Area under the curve analysis for CD127 revealed a 4.6% (1737/37,617 AU,  $p = 0.02$ ) differential when compared to T cells exposed to CeD-CGM (Figure 4D). Mean fluorescence intensity results revealed significantly reduced CD127 levels in T cells exposed to CTL-CGM in comparison with T cells exposed to CeD-CGM ( $p = 0.03$ ; Figure 4E). Non-significant differences were found between mean fluorescence intensity levels for CD127 when T cells exposed to CeD-CGM and NGM were compared (Figure 4E). Despite the limitation of the small sample size, findings still identified Tregs subsets within a T cell population exposed to CGM sourced from healthy individuals. Importantly, the absence of Treg markers within a T cell population exposed to CGM sourced from CeD patients is perhaps indicative of compromised T-reg induction or inhibited Treg-marker expression due to inhibitory secretory factors originally emanating from CeD-MoDCs.

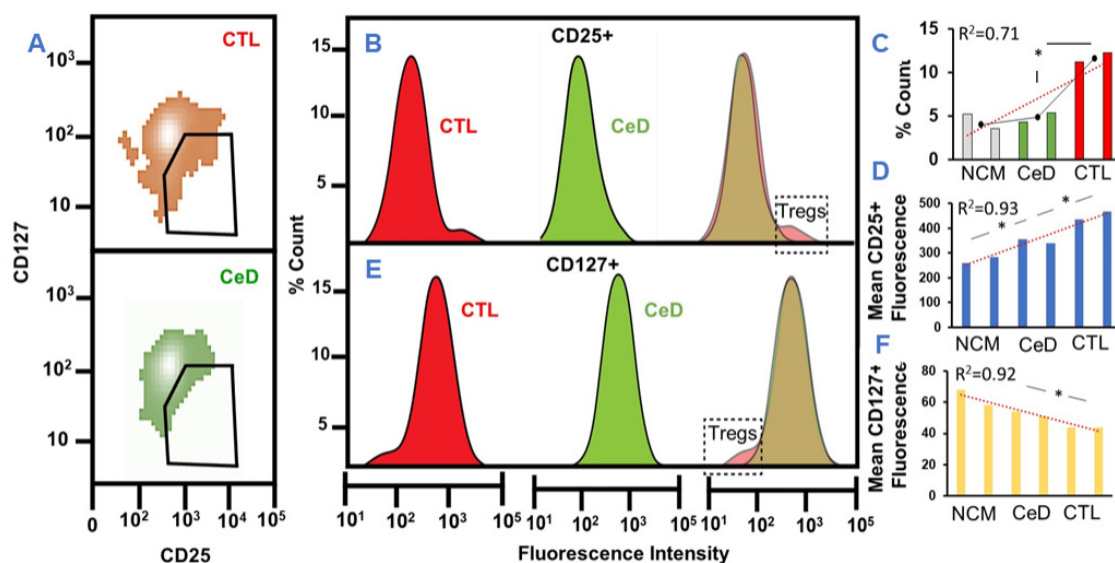


**Figure 4.** T cells exposed to CGM from CeD elicit compromised induction to Tregs (T—regulatory cells) compared to CTLs. (A) Median fluorescence intensity of CD127 versus CD25 in T cells exposed to CGM from CTL or CeD with gating shown. (B) Curved flow cytometric histograms (CFCHs) of CD25-labeled T cells showing increased percentage count of Tregs/total T cell population, 6 days after exposure to CGM from healthy CTL-MoDCs (red) compared to CGM from CeD-MoDCs (green).

Overlap of CFCHs indicating upregulated CD25 Treg profile within CTL group (dashed outlined box). (C,D) Histograms of percentage count of Tregs/T cell population (C) and mean fluorescence intensity of CD25 T cells exposed to non-conditioned media (NCM), CGM from CTL-MoDCs or CeD-MoDCs (D). (E) Curved flow cytometric histograms (CFCH) of CD127-labeled T cells showing increased percentage count of Tregs/total T cell population, 6 days after exposure to CGM from healthy CTL-MoDCs (red) compared to CGM from CeD-MoDCs (green). Overlap of CFCHs indicating downregulated CD127 Treg profile within CTL group (dashed outlined box). (F) Histograms of mean fluorescence intensity of CD127 T cells exposed to non-conditioned media (NCM), CGM from CTL-MoDCs or CeD-MoDCs. Trendline (red dashed line); mean value per group (black dots).  $R^2$  provides fitness to the linear curve value. \*p 0.05.

### 3. Discussion

Conventional cell-mediated immune responses eliminate antigen fragments by direct contact between APCs and effector T cells [37]. While this study recognized increased contact between MoDCs and T cells with time in co-culture, T cell activation occurred solely with cell-free CGM. Importantly, this investigation noted that CGM sourced from CeD patient MoDCs (CeD-CGM), in comparison with CTL-CGM, elicited alternative responses in T cells derived from healthy individuals. It also identified the enhanced uptake of HLA-DQ within such T cells stemming from CeD-CGM exosomes. In silico analysis explored the genomic basis for preferential extracellular processing of HLA-DQ within HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles associated with CeD risk, and recognized the significant increased prevalence of exosomal localization motifs. Despite increased stimulation and IL-2 secretion, healthy control T cells exposed to CeD-CGM exosomes elicited compromised induction towards Treg transformation pointing towards an extracellular basis for transportable auto-immunity.

CD86 upregulation in CeD-MoDCs has been previously reported [10]. This potent T cell co-stimulatory molecule, along with HLA class-I and -II complexes, have been found in MoDC exosomes within preformed microdomains, prompting an examination of their immunostimulatory capacities [22]. The source of such exosomes has been debated with the speculation that they arise from endocytic compartments or the external milieu to assist immune synapse formation [22,38]. Adding to this complexity, this investigation revealed that exosomes secreted from CeD-MoDCs within cell-free CGM elicited alternative responses towards T cells compared to CTL-MoDCs, offering an insight into the basis for immune dysregulation associated with this condition. Instigating increased CD3<sup>+</sup> T cell activation and IL-2 secretion, CGM from CeD-MoDC contained a higher proportion of exosomes loaded with HLA-DQ than CGM from CTL-MoDC.

Collectively, 40% of the genetic risk for CeD development is conferred by HLA genes [39]. More specifically, CeD is strongly associated with HLA-DQ [40], particularly in patients from the Czech Republic [10]. Given that monocytes were isolated from the blood of this CeD patient population and the recognized role of exosomes as MHC/HLA vehicles, this foremost study deciphered HLA-DQA1 and HLA-DQB1 for exosome targeting/localization sequences. Nucleotide cis-acting elements or motifs that prime transcripts for exosome packaging have been identified in long non-coding RNA [29,30]. While in silico findings revealed in this investigation that truncated ELMs exist in HLA alleles linked to protection, a significant over-representation of ELMs was identified within HLA alleles associated with CeD risk. The manipulation of ELMs within HLA genes will form the basis of future research to decipher the immunological implications of this foremost finding on the reprogramming of target cells.

It has been reported that the majority of MHC class II containing exosomes on the T cell surface neither fuse with the plasma membrane nor are efficiently internalized [20]. This view evolved with the recognition that DC exosomes can be efficiently transferred to activated T cells, irrespective of their TCR specificity, and rather recognized leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) as a determinant of exosome acquisition efficacy by recipient T cells [21]. Our data show the increased presence of HLA-DQ in T cells after

exposure to CeD-CGM, in comparison to CTL-CGM or NCM. While almost no HLA-DQ was evident in naïve T cells exposed to NCM, the signal was concentrated on the plasma membrane in T cells exposed to CTL-CGM. Intriguingly, the intercellular distribution of HLA-DQ was located throughout the cytosol rather than solely on the plasma membrane, potentially indicating exosomal confinement rather than membrane fusion in the case of CeD-sourced CGM.

Naïve CD4<sup>+</sup> T cells at the periphery can differentiate into induced Tregs that constitutively express CD25<sup>+</sup> (interleukin-2 receptor) and play a central role in preventing the activation of autoreactive T cells [41]. While representing only a small percentage of Tregs as a whole, this subset is highly enriched in the gut and is particularly important for tolerance against food allergens and helps maintain immune homeostasis during environmental alteration [42,43]. Importantly, their absence exacerbates pathogenesis in several models of mucosal autoimmunity, such as CeD [44]. Upregulated CD25 expression became evident in T cells only exposed to CTL-CGM indicative of their induction towards Tregs under these conditions. The notable absence of this effect in T cells exposed to CeD-CGM or NGM was potentially indicative of a compromised or lower stimulation status towards Treg induction. CD127 expression inversely correlates with the human Treg autoimmune suppressive function [45]. The results indicate that this Treg CD127 marker is evident in T cells only exposed to CTL-CGM and not CeD-CGM. It can be speculated that exosomes or another secretory factor within CGM from CeD patients inhibits Treg induction.

While understanding tissue-resident Treg cells in the development and maintenance of human autoimmunity is important, this investigation highlighted the extracellular role of HLA as determined by exosome localization nucleotide sequences to influence peripheral Treg induction and offers a wider perspective on the concept of genetic CeD susceptibility. The manipulation of genetic zip-codes responsible for exosome delivery may divert the consequences of HLA-risk allele expression assisting the restoration of immunological tolerance to gluten and represent the elusive cure for CeD association linked to familial autoimmune inheritance.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Clinical Diagnosis of CeD Patients and Pedigree Overview

CeD was diagnosed in this study population following the current guidelines, i.e., measurement of total serum IgA antibodies against tissue transglutaminase 2 (tTGA-IgA) being 2–10 times the upper limit of normal (10 ULN) and biopsy examination [46]. Written informed consent was obtained from all individuals involved in this study with approval from the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic (approval number: G-18–23). A total of 11 participants (n = 11) were enrolled, as previously reported [10], and categorized as follows: Gluten-free diet (GFD)-treated CeD patients (CeD: n = 4); normal controls with no known auto-immune disease, inflammation or malignancy (CTL: n = 7). All subjects were Caucasians of European ancestry.

##### 4.2. Monocyte Isolation from Peripheral Blood Mononuclear Cells

This procedure follows what was previously reported [10]. Peripheral whole blood was collected from CeD and CTL participants (outlined above) by a phlebotomist employed in the Department of Medical Genetics of the Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic. Following dilution with RPM1 1640 medium (1:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), whole blood was gently layered over Ficoll–Paque in a 1:0.7 ratio (GE HealthCare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) in a Falcon tube. Following centrifugation for 30 min at 400 g, distinct layers were formed. The presence of peripheral-blood mononuclear cells (PBMCs) at the interface of the top and second layers beneath the plasma zone were noted. Using a pipette, the plasma layer was removed, and PBMCs transferred to room temperature (RT)-complete RPM1 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to remove any remaining platelets. Following centrifugation for 20 min at 400 g,

samples of PBMCs were stained with trypan blue, viewed under a light microscope and counted on a hemocytometer slide. PBMCs ( $10^6$  cells) were cultivated for 2 h in a 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flask (Schoeller Pharma, Prague, Czech Republic) in complete medium (CM) containing RPMI 1640, fetal bovine serum (10%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in the presence of antibiotic–antimycotic solution (1%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and 95% relative humidity. The non-adherent fraction was then removed following washing with CM.

#### 4.3. Generation of Monocyte-Derived Dendritic Cells (MoDCs) and Conditioned Growth Media (CGM)

Adherent monocytes were cultivated in CMI (CM with inclusion of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (500 ng/mL; Sigma-Aldrich, MO, USA) and human interleukin-4 (IL-4) (200 ng/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) for 6 days at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% relative humidity in a 75 cm<sup>2</sup> plastic culture flask (Schoeller Pharma, Prague, Czech Republic), as previously reported [10]. CMI was replaced with CMII (i.e., CMI with exosome depleted fetal bovine serum instead (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, cat. A2720801)) on day 3. Generated MoDCs (CD11c<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>) were divided into 6-well plates (Schoeller Pharma, Prague, Czech Republic) with the addition of lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cultivated for 24 h to induce MoDC maturation. Mature MoDCs were harvested by a cell scraper and briefly centrifuged at 400 g. Harvesting of CGM then occurred, i.e., CMII exposed to CeD- or CTL-derived MoDCs. Residual MoDCs were removed from the CGM through centrifugation at 1000 g for 30 min. The supernatant representing cell-free CGM was stored at −80 °C for downstream applications.

##### 4.3.1. Isolation of Exosomes from CGM

Exosomes were pelleted from CGM (10 mL) following ultracentrifugation at 100,000 g for 90 min. The exosomal pellet was re-suspended in 50 mL T-PER reagent (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, cat. # 78510) with the addition of protease-inhibitor cocktail (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, cat. # 87785). Protein concentration was determined with a bicinchoninic acid assay (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, cat. # 23225).

##### 4.3.2. Western Blotting Detection of Exosomal HLA-DQ and CD63

Proteins (3 g per lane) mixed with NuPage LDS sample buffer (1X, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA cat # NP0008) were separated by electrophoresis in pre-cast 12% Bis Tris NuPage gels (1.0 mm 12 well, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA cat. # NP0342BOX). HLA-DQ and CD63 were identified by Western blotting using antibodies indicated below and goat anti-mouse or human HRP secondary antibodies (1 in 10,000 in TBS-T) and a chemiluminescence detection kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, cat # 89880). Images were obtained using a ChemiDoc imager (Bio-Rad, Hertfordshire, United Kingdom). Nytran filters were stained in Ponceau S solution (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, cat # ab270042) to enable normalization using common non-specific banding.

#### 4.4. T Cell Isolation from Peripheral Whole Blood and Cultivation in CGM

Peripheral whole blood from CTL participants was acquired (10 mL) into collection tubes containing an EDTA anticoagulant. In order to avoid internalization of the CD3 molecule, whole blood was placed on ice. CD3<sup>+</sup> T cells were isolated by magnetic bead isolation according to the manufacturer's protocol (Dynabeads<sup>®</sup> FlowComp<sup>™</sup> Human CD3, Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; cat. number 11365D). In brief, the FlowComp<sup>™</sup> Human CD3 Antibody (12.5 L/mL whole blood) was added directly to anti-coagulated whole blood on ice. After mixing and incubation on ice for 10 min, isolation buffer (20 mL; Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free PBS supplemented with 0.1% BSA and 2 mM EDTA) was added, followed by centrifugation for 15 min at 350 g. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in FlowComp<sup>™</sup> Dynabeads<sup>®</sup> (375 L) and mixed well by vortexing.

After incubation with rotation for 15 min at RT, isolation buffer (20 mL) was added and placed on a magnet for 3 min. CD3 negative cells were removed from the supernatant. The pellet was resuspended in FlowComp™ Release Buffer (5 mL) containing biotin in 0.1% BSA and 2 mM EDTA, incubated for 10 min RT and placed again on the magnet. CD<sup>+</sup> T cells were isolated from the supernatant by centrifugation for 8 min at 350 g, and resuspended in CGM. Harvested CD3<sup>+</sup> T cells were phenotyped by flow cytometry and IL-2 cytokine secretion (see below). Verified CD3<sup>+</sup> T cells (1 × 10<sup>5</sup>/well/24-well dish (TPP, Trasadingen, Switzerland)) were cultivated for 6 days in CGM at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere and 95% relative humidity.

#### 4.5. Co-Cultivation of MoDCs and T Cells

Mature MoDCs (1 × 10<sup>5</sup>/well) and CD3<sup>+</sup> T cells (1 × 10<sup>6</sup>/well) were co-cultivated on poly-L-lysine-treated coverslips in 24-well tissue culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) at 5% CO<sub>2</sub>/95% relative humidity in CMI for 6 days. During this time, co-cultured cells were washed in 1 PBS after removal of CMI and serially fixed in 4% paraformaldehyde on days 1, 3 and 6. Coverslips were transferred to microscopic slides and MoDC–T cell interaction determined by proximity evaluation using an Olympus BX53M microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

#### 4.6. Identification and Quantification of ELMs in HLA-DQA1 and HLA-DQB1

HLA-DQA1 and HLA-DQB1 allele transcript sequences derived from the Immuno-Polymorphism Database—International Immunogenetics Project—Human Leukocyte Antigen (IPD-IMGT/HLA) [31,47] were used for determining the presence or absence of previously reported ELMs (i.e., ACCAGCCU; CAGUGAGC; UAAUCCCA) [29,30]. Motifs (ACCAGCCU; CAGUGAGC; UAAUCCCA i.e., 5 bp from 3′) were counted per HLA-DQA1 and HLA-DQB1 allele transcript. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles associated with CeD protection or risk [39] were evaluated for full and truncated versions of these ELM sequences.

#### 4.7. Immunohistochemical Detection and Confocal Microscopic Visualization of HLA-DQ on T Cells Exposed to CGM

T cells were cultivated in CGM, as outlined above, on glass coverslips. After 6 days, T cells were washed in 1 PBS twice for 5 min and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min. After another wash in 1 PBS for 5 min, T cells were permeabilized in 1 TBST (1 TBS, including 0.5% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) for 1 h. Following one wash for 5 min in 1 PBS, T cells were placed in blocking solution (1 TBS containing 5% bovine serum albumin and 0.5% Triton X-100) for 1 h at RT. T cells were then exposed to FITC-conjugated HLA-DQ (clone Tu169 specific for HLA-DQ1 and DQ2 antigens, BD Biosciences, CA, USA; 1:100 in blocking solution; details above) overnight at 4 °C. Samples were washed 3 times for 15 min in 1 PBS at RT. Coverslips were air-dried in the dark, mounted in ProLong® Gold Antifade reagent (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA.; cat. # 8961S) containing DAPI and placed on glass microscopic slides. Images were acquired as single XY planes with the pinhole set to Airy1 on an inverted confocal laser scanning microscope Leica TCS SP5 (DMI6000, Leica Microsystems, Mannheim, Germany) using an HCX PL Fluotar lambda blue 40.0 0.75 dry objective.

#### 4.8. IL-2 ELISA Detection as a Marker of T Cell Activation

T cells were cultivated in CGM for 6 days, as indicated above. Subsequently, the CGM was removed, centrifuged at 2000 g for 10 min to remove any cells and processed for the cytokine IL-2 using Human IL-2 SimpleStep ELISA® Kit (Abcam, Cambridge, UK; cat # ab270883). This kit used an affinity tag labeled capture antibody and a reporter conjugated detector antibody that immunocaptured the sample IL-2 in solution. The entire complex (capture antibody/analyte/detector antibody) was immobilized via the immuno-affinity of an anti-tag antibody coating the well. Samples or standards were added to the wells,

followed by the antibody mix. Following incubation, the wells were washed to remove unbound material. Development solution supplied with the kit was added with incubation enabling HRP catalysis, and the generation of a blue color. The reaction was stopped by the addition of Stop Solution (supplied in the kit) completing any color change from blue to yellow. A signal was generated proportionally to the amount of bound IL-2 and optical density measurements obtained at 450 nm. Duplicate readings were averaged for standards and samples.

#### 4.9. Flow Cytometry and FACS Staining

Isolated T cells were cultivated for 6 days in 24-well Tissue Culture Test Plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) in the presence of CGM at 37 C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. On day 6, T cells were manually removed using a cell scraper, briefly centrifuged at 400 g and resuspended in 100 L RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with monoclonal antibodies (see below) added according to the manufacturer's recommendation, and incubated for 20 min at 4 C in the dark. The following monoclonal antibodies were used: Mouse FITC-conjugated anti-Human HLA-DQ (clone Tu169; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), PE Mouse Anti-Human CD127 (clone R34.34; Beckman Coulter Company, Brea, CA, USA), PC5 Mouse Anti-Human CD25 (clone B1.49.9; Beckman Coulter Company, Brea, CA, USA) and Anti-Human CD3 PerCP (clone SK7; EXBIO, Prague, Czech Republic), Anti-Human CD63 APC (clone MEM-259; EXBIO, Prague, Czech Republic). An additional wash was performed after incubation. T cells were resuspended in cold PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with analysis performed on a BD FACSVerser flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data were analyzed with BD FACSuite™ Software. All images and graphs were generated and assembled using GraphPad PRISM v3.0 and Inkscape v1.0.1 with axes reflective of voltage and fluorescence detector settings.

#### 4.10. Statistical Analysis

Data comparison was performed using unpaired Student's t-test in GraphPad PRISM 3.0 or Microsoft Excel software. Variation was represented as standard error. Values of p 0.05 were considered significant.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23116102/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization: M.H. and V.B.O.; Data curation: M.H., K.R. and I.J.; Formal analysis: M.H. and S.V.O.; Methodology: M.H., I.J. and V.B.O.; Project administration: M.H. and V.B.O.; Supervision: M.Č. and V.B.O.; Visualization: M.H., V.B.O. and S.V.O.; Writing—original draft: M.H. and V.B.O.; Writing—revision and editing: M.H. and V.B.O. All authors have read and agreed to the final version of the manuscript.

**Funding:** This study was financially supported by Charles University, Third Faculty of Medicine, Prague, CZ; Research Program COOPERATIO (grant number 207036): The scientific project Medical Diagnostics and Basic Medical Sciences—field 'Medical Genetics'.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Institute for Clinical and Experimental Medicine and Thomayer Hospital, Prague, Czech Republic (date of approval: 13 June 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restrictions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Maki, M.; Collin, P. Coeliac disease. *Lancet* **1997**, *349*, 1755–1759. [[CrossRef](#)]
2. Marsh, M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* **1992**, *102*, 330–354. [[CrossRef](#)]

3. Sollid, L.M. Coeliac disease: Dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 647–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Shan, L.; Molberg, Ø.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G.M.; Sollid, L.M.; Khosla, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **2002**, *297*, 2275–2279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Malamut, G.; Matysiak-Budnik, T.; Grosdider, E.; Jais, J.-P.; Morales, E.; Damotte, D.; Caillat-Zucman, S.; Brousse, N.; Cerf-Bensussan, N.; Jian, R.; et al. Adult celiac disease with severe or partial villous atrophy: A comparative study. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **2008**, *32*, 236–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Visser, J.; Rozing, J.; Sapone, A.; Lammers, K.; Fasano, A. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: Celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1165*, 195–205. [[CrossRef](#)]
7. Schumann, M.; Siegmund, B.; Schulzke, J.D.; Fromm, M. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *3*, 150–162. [[CrossRef](#)]
8. Szalowska, D.; Bak-Romaniszyn, L. Family recognition of celiac disease. *Prz. Gastroenterol.* **2013**, *8*, 390–395. [[CrossRef](#)]
9. Lundin, K.E.; Wijmenga, C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2015**, *12*, 507–515. [[CrossRef](#)]
10. Hudec, M.; Riegerova, K.; Pala, J.; Kutna, V.; Cerna, M.; VB, O.L. Celiac Disease Defined by Over-Sensitivity to Gliadin Activation and Superior Antigen Presentation of Dendritic Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9982. [[CrossRef](#)]
11. Lebewohl, B.; Sanders, D.S.; Green, P.H.R. Coeliac disease. *Lancet* **2018**, *391*, 70–81. [[CrossRef](#)]
12. Zajacova, M.; Kotrbova-Kozak, A.; Cerna, M. HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 genotyping of 180 Czech individuals from the Czech Republic pop 3. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 365–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Laupeze, B.; Fardel, O.; Onno, M.; Bertho, N.; Drenou, B.; Fauchet, R.; Amiot, L. Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib, and II molecules on monocytes-derived dendritic and macrophagic cells. *Hum. Immunol.* **1999**, *60*, 591–597. [[CrossRef](#)]
14. Nouri-Shirazi, M.; Banchereau, J.; Bell, D.; Burkeholder, S.; Kraus, E.T.; Davoust, J.; Palucka, K.A. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 3797–3803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Palova-Jelinkova, L.; Rozkova, D.; Pecharova, B.; Bartova, J.; Sediva, A.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Spisek, R.; Tuckova, L. Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 7038–7045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Raki, M.; Tollefsen, S.; Molberg, O.; Lundin, K.E.; Sollid, L.M.; Jahnsen, F.L. A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology* **2006**, *131*, 428–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Raposo, G.; Nijman, H.W.; Stoorvogel, W.; Liejendekker, R.; Harding, C.V.; Melief, C.J.; Geuze, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **1996**, *183*, 1161–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Thery, C.; Boussac, M.; Veron, P.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; Garin, J.; Amigorena, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 7309–7318. [[CrossRef](#)]
19. Wubbolts, R.; Leckie, R.S.; Veenhuizen, P.T.; Schwarzmann, G.; Mobius, W.; Hoernschemeyer, J.; Slot, J.W.; Geuze, H.J.; Stoorvogel, W. Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 10963–10972. [[CrossRef](#)]
20. Buschow, S.I.; Nolte-’t Hoen, E.N.; van Niel, G.; Pols, M.S.; ten Broeke, T.; Lauwen, M.; Ossendorp, F.; Melief, C.J.; Raposo, G.; Wubbolts, R.; et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* **2009**, *10*, 1528–1542. [[CrossRef](#)]
21. Nolte-’t Hoen, E.N.; Buschow, S.I.; Anderton, S.M.; Stoorvogel, W.; Wauben, M.H. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood* **2009**, *113*, 1977–1981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zitvogel, L.; Regnault, A.; Lozier, A.; Wolfers, J.; Flament, C.; Tenza, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Raposo, G.; Amigorena, S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: Dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 594–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kowal, J.; Arras, G.; Colombo, M.; Jouve, M.; Morath, J.P.; Primdal-Bengtson, B.; Dingli, F.; Loew, D.; Tkach, M.; Thery, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E968–E977. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kanamori, M.; Nakatsukasa, H.; Okada, M.; Lu, Q.; Yoshimura, A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 803–811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Longhi, M.S.; Ma, Y.; Bogdanos, D.P.; Cheeseman, P.; Mieli-Vergani, G.; Vergani, D. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in autoimmune liver disease. *J. Hepatol.* **2004**, *41*, 31–37. [[CrossRef](#)]
26. Kumar, V.; Sercarz, E. An integrative model of regulation centered on recognition of TCR peptide/MHC complexes. *Immunol. Rev.* **2001**, *182*, 113–121. [[CrossRef](#)]
27. Gurunathan, S.; Kang, M.H.; Jeyaraj, M.; Qasim, M.; Kim, J.H. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. *Cells* **2019**, *8*, 307. [[CrossRef](#)]
28. Munich, S.; Sobo-Vujanovic, A.; Buchser, W.J.; Beer-Stolz, D.; Vujanovic, N.L. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncoimmunology* **2012**, *1*, 1074–1083. [[CrossRef](#)]

29. Batagov, A.O.; Kuznetsov, V.A.; Kurochkin, I.V. Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genom.* **2011**, *12* (Suppl. 3), S18. [[CrossRef](#)]
30. O'Leary, V.B.; Ovsepian, S.V.; Carrascosa, L.G.; Buske, F.A.; Radulovic, V.; Niyazi, M.; Moertl, S.; Trau, M.; Atkinson, M.J.; Anastasov, N. PARTICLE, a Triplex-Forming Long ncRNA, Regulates Locus-Specific Methylation in Response to Low-Dose Irradiation. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 474–485. [[CrossRef](#)]
31. Maccari, G.; Robinson, J.; Hammond, J.A.; Marsh, S.G.E. The IPD Project: A centralised resource for the study of polymorphism in genes of the immune system. *Immunogenetics* **2020**, *72*, 49–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kovacs, A.A.Z.; Kono, N.; Wang, C.H.; Wang, D.; Frederick, T.; Operskalski, E.; Tien, P.C.; French, A.L.; Minkoff, H.; Kassaye, S.; et al. Association of HLA Genotype With T Cell Activation in Human Immunodeficiency Virus (HIV) and HIV/Hepatitis C Virus-Coinfected Women. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221*, 1156–1166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kondelkova, K.; Vokurkova, D.; Krejsek, J.; Borska, L.; Fiala, Z.; Ctirad, A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica* **2010**, *53*, 73–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Guo, J.; Zhou, X. Regulatory T cells turn pathogenic. *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *12*, 525–532. [[CrossRef](#)]
35. Zheng, S.G.; Gray, J.D.; Ohtsuka, K.; Yamagiwa, S.; Horwitz, D.A. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 4183–4189. [[CrossRef](#)]
36. Takahashi, T.; Tagami, T.; Yamazaki, S.; Uede, T.; Shimizu, J.; Sakaguchi, N.; Mak, T.W.; Sakaguchi, S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 303–310. [[CrossRef](#)]
37. Gaudino, S.J.; Kumar, P. Cross-Talk Between Antigen Presenting Cells and T Cells Impacts Intestinal Homeostasis, Bacterial Infections, and Tumorigenesis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 360. [[CrossRef](#)]
38. Turley, S.J.; Inaba, K.; Garrett, W.S.; Ebersold, M.; Unternaehrer, J.; Steinman, R.M.; Mellman, I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **2000**, *288*, 522–527. [[CrossRef](#)]
39. Robins, G.; Howdle, P.D. Advances in celiac disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2005**, *21*, 152–161. [[CrossRef](#)]
40. Perez-Bravo, F.; Araya, M.; Mondragon, A.; Rios, G.; Alarcon, T.; Roessler, J.L.; Santos, J.L. Genetic differences in HLA-DQA1\* and DQB1\* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile. *Hum. Immunol.* **1999**, *60*, 262–267. [[CrossRef](#)]
41. Shevach, E.M. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: More questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* **2002**, *2*, 389–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Hadis, U.; Wahl, B.; Schulz, O.; Hardtke-Wolenski, M.; Schippers, A.; Wagner, N.; Muller, W.; Sparwasser, T.; Forster, R.; Pabst, O. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* **2011**, *34*, 237–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Josefowicz, S.Z.; Niec, R.E.; Kim, H.Y.; Treuting, P.; Chinen, T.; Zheng, Y.; Umetsu, D.T.; Rudensky, A.Y. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* **2012**, *482*, 395–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Dominguez-Villar, M.; Hafler, D.A. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 665–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Liu, H.; Leung, B.P. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in health and disease. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2006**, *33*, 519–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Husby, S.; Koletzko, S.; Korponay-Szabo, I.; Kurppa, K.; Mearin, M.L.; Ribes-Koninckx, C.; Shamir, R.; Troncone, R.; Auricchio, R.; Castillejo, G.; et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2020**, *70*, 141–156. [[CrossRef](#)]
47. Robinson, J.; Halliwell, J.A.; McWilliam, H.; Lopez, R.; Marsh, S.G. IPD—The Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D1234–D1240. [[CrossRef](#)]