

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Dendritikus sejtek immunmoduláló funkcióinak szabályozása
endogén és exogén módokon

Ágics Beatrix

Témavezető: Dr. Pázmándi Kitti Linda



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
I. Bevezetés	8
II. Irodalmi áttekintés	9
II.1 A DS-ek jelentősége, eredete és altípusai	9
II.2 A vérben lévő DS altípusok specializált funkciói	10
II.3 A DS-ek érése és differenciálódása	14
II.4 A DS-ek mintázatfelismerő receptorai (PRR)	17
II.4.1 A DS-ek Toll-szerű receptorai (TLR)	17
II.4.2 A DS-ek szolubilis citoszolikus szenzorai	21
II.5 A DS funkciók szabályozása endogén módon	24
II.5.1 Az mTOR jelátviteli útvonal a DS-ekben	24
II.5.2 Az mTOR jelentősége a DS-ek immunmoduláló funkcióinak szabályozásában	27
II.6 A DS funkciók szabályozása exogén módon	32
II.6.1 A környezeti mikrobák szerepe az immunstátusz kialakításában: higiénia hipotézis és farm hatás	32
II.6.2 Az LPS szerkezete	37
II.6.3 Az LPS felismerése és hatásai	41
II.6.4 Az LPS toxicitásának befolyásolása	44
III. Célkitűzések	47
IV. Anyagok és módszerek	48
IV.1 A primer humán sejtek izolálása és differenciáltatása	48
IV.2 GEN2.2 humán pDS sejt vonal	49
IV.3 A vezikuláris stomatitis vírus (VSV) szaporítása és a vírus titer meghatározása	49
IV.4 Bakteriális endotoxin készítmények előállítása	50
IV.5 Sejtek kezelése	51
IV.6 A DS-ek fenotípusos és életképesség vizsgálata áramlási citometriával	51
IV.7 Western blot analízis	52
IV.8 Kvantitatív valós idejű PCR	53
IV.9 Enzim-kötött immunoszorbens esszé (ELISA) és laktát esszé	53
IV.10 Az intracelluláris reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelésének mérése humán moDS-ekben	54

IV.11 T-sejtek proliferációjának és aktivitásának vizsgálata áramlási citometriával.....	54
IV.12 T-sejtek citokin termelésének vizsgálata enzim-kötött immunospot (ELISPOT) módszer segítségével	55
IV.13 Ultra-nagynyomású folyadékkromatográfia (UHPLC) elektropray-ionizációs négypólusú repülési idő tömegspektrometriával (ESI-QTOF-MS).....	56
IV.14 <i>In vivo</i> egérkísérletek	57
IV.15 Statisztikai analízis	57
V. Eredmények	59
V.1 Endogén immunmoduláció: mTOR szabályozó szerepének vizsgálata	
a humán DS-ek RLR aktiváció indukált immunválaszaiban.....	59
<i>V.1.1 mTOR aktivitás vizsgálata az RLR aktivált moDS-ekben</i>	59
<i>V.1.2 Az mTOR gátlás hatása a moDS-ek RLR közvetített metabolikus változásaira</i>	62
<i>V.1.3 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata az RLR-stimulált humán moDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban</i>	64
<i>V.1.4 Az mTOR aktivitás vizsgálata az RLR aktivált humán pDS-ekben</i>	72
<i>V.1.5 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata az RLR-aktivált humán pDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban</i>	75
<i>V.1.6 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek T-sejt aktiváló funkcióiban</i>	83
V.2 Exogén immunmoduláció: A sugárzással méregtelenített LPS immunmoduláló hatásának vizsgálata humán moDS-eken	89
<i>V.2.1 A natív és sugárdetoxifikált endotoxin humán moDS-ek életképességére és fenotípusos érésére gyakorolt hatásainak vizsgálata</i>	89
<i>V.2.2 Az N-LPS és az RD-LPS hatásainak vizsgálata a humán moDS-ek citokin termelésére</i>	91
<i>V.2.3 Az N-LPS és az RD-LPS endotoxin toleranciát indukáló képességének vizsgálata humán moDS-ekben</i>	93
<i>V.2.4 Az N-LPS és az RD-LPS T-sejt aktiváló hatásainak vizsgálata humán moDS-ekben</i>	94
<i>V.2.5 Az RD-LPS mirisztinsav tartalmával összefüggő immunmoduláló hatások vizsgálata</i>	96

<i>V.2.6 Az RD-LPS immunmoduláló hatásának vizsgálata a pollen által kiváltott légúti allergiás gyulladás egérmodelljében</i>	<i>97</i>
VI. Megbeszélés	100
VI.1 DS funkciók endogén szabályozása: Az mTOR szerepe a humán DS-ek RLR-által közvetített vírusellenes válaszaiban.....	100
VI.2 DS funkciók exogén szabályozása: sugárdetoxifikált LPS immunmoduláló hatásainak vizsgálata humán moDS-eken	104
VII. Összefoglalás	109
VIII. Irodalomjegyzék.....	113
IX. Kulcsszavak	128
X. Saját közlemények jegyzéke	129
XI. Köszönetnyilvánítás	131

Rövidítések jegyzéke

Rövidítések	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
3p-hpRNS	5'triphosphate-hairpin RNA	5'trifoszfát-hajtú RNS
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje 1
5'ppp	5'triphosphate	5'trifoszfát
7-AAD	7-aminoactinomycin D	7-aminoaktinomycin-D
AIM2	absent in melanoma 2	melanomában hiányzó fehérje 2
Akt	protein kinase B	protein kináz B
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP-aktivált protein kináz
AP1	activator protein1	aktivátor fehérje 1
APS	antigen-presenting cell	antigén prezentáló sejt
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-trifoszfát
B-sejt	B- lymphocyte	B-limfocita
CARD	caspase activation and recruitment domain	kaspáz aktivációs és toborzó domén
CD	cluster of differentiation	differenciációs klaszter
cDS	conventional or classical dendritic cell	konvencionális vagy klasszikus dendritikus sejt
CpG	cytosine-phosphate-guanine	citozin-foszfát-guanin
CREB	c-AMP response element binding protein	ciklikus AMP válaszadó elem-kötő fehérje
DAMP	damage-associated molecular pattern	veszély asszociált molekuláris mintázat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential médium
DMSO	dimethyl sulfoxide	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxyribonucleic acid	dezoxiribonukleinsav
DS	dendritic cell	dendritikus sejt
ds	double-stranded	kétszálú
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzim-kapcsolt immunoszorbens esszé

ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatikus retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase	extracelluláris szignál-szabályozott kináz
FACS	fluorescence-activated cell sorting	fluoreszcencia-aktivált sejt elválasztás
FBS	fetal bovine serum	magzati szarvasmarha szérum
FITC	fluorescein isothiocyanate	fluoreszcein-izotiocianát
Flt3L	fms-like tyrosine kinase 3 ligand	fms-szerű tirozin kináz-3-ligand
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
GMDP	granulocyte- monocyte and DC progenitor	granulocita-monocita-DS progenitor
HIF-1α	hypoxia-inducible factor -1 α	hypoxia indukálta faktor-1 α
HIV	human immunodeficiency virus	humán immundeficiencia vírus
HK2	hexokinase 2	hexokináz 2
HLA	human leukocyte antigen	humán leukocita antigén
IFN	interferon	interferon
Ig	immunoglobulin	immunglobulin
IKK	I κ B kinase	I κ B-kináz
IL	interleukin	interleukin
IRAK1	interleukin-1 receptor-associated kinase 1	interleukin-1 receptorhoz kapcsolt kináz 1
IRF	interferon regulatory factor	interferon regulatórikus faktor
IκB $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon$	inhibitor of nuclear factor- κ B $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon$	κ B nukleáris faktor gátlója $\alpha/\beta/\gamma/\epsilon$
JNK	c-jun N-terminal kinase	c-jun N-terminális kináz
Kdo	2-keto-3-deoxy-octulosonic acid	2-keto-3-dezoxi-oktanoilsav
LBP	LPS-binding protein	LPS-kötő fehérje
LDHA	lactate-dehydrogenase-A	laktát-dehidrogenáz-A
LPS	lipopolysaccharide	lipopoliszacharid
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogén aktivált protein kináz
MAVS	mitochondrial antiviral-signaling protein	mitokondriális antivirális szignalizációs fehérje
MD2	myeloid differentiation protein 2	mieloid differenciálódási fehérje 2

MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5	melanoma differenciálódáshoz kapcsolódó fehérje 5
MDP	monocita and DC progenitor	monocita és DS progenitor
mDS	myeloid DC	mieloid DS
MHC	major histocompatibility complex	fő hisztokompatibilitási komplex
moDS	monocyte-derived dendritic cell	monocita-eredetű dendritikus sejt
MOI	multiplicity of infection	fertőzés multiplicitás
mTOR	mammalian target of rapamycin	rapamycin emlős célpont
mTORC	mTOR complex	mTOR komplex
MyD88	myeloid differentiation primary response 88	mieloid differenciálódási primer válasz fehérje 88
NF-κB	nuclear factor-kappaB	nukleáris faktor-kappaB
N-LPS	native LPS	natív LPS
NLR	NOD-like receptor	NOD-szerű receptor
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	NLR család pirin domént tartalmazó fehérje 3
NOD	nucleotide oligomerization domain	nukleotid-kötő oligomerizációs domén
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	patogén asszociált molekuláris mintázat
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	perifériás vér mononukleáris sejt
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz láncreakció
PDK1	phosphoinositide-dependent protein kinase-1	foszfoinozítid-függő protein kináz 1
PDL1	programmed death-ligand 1	programozott halál ligand 1
pDS	plasmacytoid dendritic cell	plazmacitoid dendritikus sejt
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-3 kinase	foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát-3 kináz
polyI:C	polyinosinic:polycytidylic acid	poliinozin:policitidilsav
PRR	pattern recognition receptor	mintázat felismerő receptor
PTEN	phosphatase and tensin homolog	foszfatáz és tenzin homológ
RD-LPS	radiation-detoxified LPS	sugárzással méregtelenített LPS

RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	retinsav-indukálható gén I
RLR	retinoic acid-inducible gene-I-like receptor	retinsav-indukálható gén I-szerű receptor
RNS	ribonucleic acid	ribonukleinsav
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén származékok
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	Roswell Park Memorial Institute médium
S6K1	ribosomal S6 kinase 1	riboszomális S6 kináz 1
SD	standard deviation	szórás
SREBP	sterol regulatory- element binding protein	szterol szabályozó elemet kötő fehérje
ss	single-stranded	egyszálú
STAT	signal transducer and activator of transcription	transzkripció jelátalakító és aktiváló
STING	stimulator of interferon genes	interferon gén stimulátor
TAB	TAK1-binding protein	TAK1-kötő protein
TAK1	transforming growth factor- β -activated kinase 1	transzformáló növekedési faktor β aktivált kináz 1
TBK1	TANK-binding kinase 1	TANK-kötő kináz 1
Tc	cytotoxic T lymphocytes	citotoxikus T-limfocita
TCR	T-cell receptor	T-sejt receptor
tDS	transitional dendritic cell	tranzícionális dendritikus sejt
Tfh	T follicular helper cell	follikuláris helper T-sejt
Th	T helper lymphocyte	segítő T-limfocita
TIR	Toll-interleukin-1 receptor	Toll-interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein	TIR-domént tartalmazó adapter fehérje
TLR	Toll-like receptor	Toll-szerű receptor
TNF-α	tumor necrosis factor- α	tumor nekrozis faktor- α
TRAF	TNF receptor associated factor	TNF receptorhoz kapcsolt faktor
Treg	T regulatory cells	regulatórikus T-sejtek
TRIF	TIR-domain-containing adapter- inducing interferon- β	TIR-domént tartalmazó adapter indukáló interferon β
TSC	tuberous sclerosis complex	gumós szklerózis komplex
VSV	vesicular stomatitis virus	vezikuláris stomatitis vírus

I. Bevezetés

A veleszületett immunrendszer sejtjeiként a dendritikus sejteknek (DS) kiemelkedő szerepe van a szervezetbe kerülő patogének felismerésében és a gyulladásos folyamatok elindításában. Ugyanakkor egyik legfontosabb immunológiai funkciójuk az antigénprezentálás, ami révén képesek bemutatni a periférián felvett antigéneket a T-sejtek számára és ezáltal elindítani az adaptív immunválaszokat is. A DS-ek egyedülálló immunmoduláló képességgel rendelkeznek. Az érzékelt jelek fajtájától függően képesek gyulladás és tolerancia irányába is eltolni az immunválaszokat, továbbá befolyásolják a T-sejt polarizáció irányát is, így a humán DS-ek sokoldalú terápiás célpontok lehetnek. Funkcionális aktivitásukat számos endogén szabályozó mechanizmus felügyeli és irányítja, valamint exogén stimulációs jelekkel is nagymértékben befolyásolhatóak a DS funkciók. Munkánk során célul tűztük ki, hogy különböző endogén és exogén behatások révén megpróbáljuk befolyásolni a DS-ek immunmoduláló képességét, ami alapjául szolgálhat jövőbeli DS alapú terápiás megoldásoknak. Elsőként a DS-ek egyik belső, központi szabályozó rendszerének, azaz a rapamycin emlős célpontnak (mTOR) a szabályozó szerepét vizsgáltuk meg a citoszólban szaporodó vírusok felismerésére specializálódott retinsav-indukálható gén- (RIG) I-szerű receptorok (RLR) által közvetített DS funkciókban. Munkánk során mTOR inhibitorok segítségével átfogóan tanulmányoztuk az mTOR jelátvitel jelentőségét a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) és plazmacitoid DS-ek (pDS) RLR-mediált antivirális és gyulladásos citokin válaszaiban és T-sejt aktiváló képességében, mellyel a különböző mTOR inhibitorok DS-ek funkcionalitását érintő hatásait is feltártuk. További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az exogén stimulációs szignálok módosításával hogyan befolyásolható a DS-ek immunmoduláló hatásai. Így sugárzással méregtelenített lipopoliszacharid (RD-LPS) moDS-ekre gyakorolt hatását hasonlítottuk össze natív LPS-sel (N-LPS). Megvizsgáltuk továbbá az RD-LPS hatását a parlagfű által kiváltott allergiás légúti gyulladásokban is, és megállapítottuk, hogy a beltéri környezet méregtelenített LPS-sel történő renaturálásával megelőzhető lehet a Th2 mediált allergiás gyulladások kialakulása, mivel az RD-LPS-sel a DS-ek Th1 polarizáló képessége fokozható, ami háttérbe szorítja a Th2 válaszokat. Munkánk során tehát új, endogén és exogén szignálok révén megvalósuló immunmodulációs lehetőségeket tártunk fel, mellyel befolyásolható a DS-ek funkcionális aktivitása és ezáltal a szervezetben zajló különböző gyulladásos folyamatok és immunológiai reakciók kimenetele.

II. Irodalmi áttekintés

II.1 A DS-ek jelentősége, eredete és altípusai

Az emberi szervezet immunrendszerének hatékony működését és az immunhomeosztázis fenntartását a természetes, valamint az adaptív immunitás elemeinek szoros kapcsolata, funkcióiknak egymásra épülése biztosítja. E kétszintű védelmi vonal a szervezetbe kerülő nem saját (vírusok, baktériumok, gombák, paraziták, férgek) vagy megváltozott saját struktúrák (tumorossá vált vagy patogénnel fertőzött sejtek) ellen immunreakciókat indít. A természetes immunrendszer szervezetünk első védelmi vonala, melynek elemei között találjuk a DS-eket is, melyek a patogének szervezetbe kerülését követően azonnal felismerik az idegen struktúrákat és a kórokozók antigén specificitásától függetlenül azonnali reakciókat indítanak el [1].

A DS-ek heterogén csoportjainak azonosítása a perifériás vérben, valamint antigén-prezentáló képességük funkcionális elemzése fontos mérföldkő volt az immunológia történetében [2]. A DS-ek professzionális antigén prezentáló sejtekként (APS) nagy jelentőséggel bírnak a veleszületett és az adaptív immunrendszer közötti kapcsolat kiépítésében mivel meghatározó szerepük van az antigének érzékelésében, felvételében, feldolgozásában, a T-sejtek felé történő bemutatásában és ezáltal az adaptív immunitás aktiválásában. A DS-ek sokrétű funkcionális aktivitása nélkülözhetetlen a hatékony immunválaszhoz, ugyanis a naiv T-sejt aktiválás mellett részt vesznek a memória T-sejtek létrehozásában is, továbbá képesek segíteni a B-sejt aktivációt is, így az adaptív immunválasz indukálása mellett az immunológiai memória kialakításában is szerepet vállalnak [3,4]. Továbbá a DS-ek hozzájárulnak a stabil immunhomeosztázis és a saját szövetek elleni immunológiai tolerancia fenntartásához is, mivel fiziológiás körülmények között is folyamatosan bemutatják a szöveti eredetű saját antigéneket a $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejteknek [5].

A DS-ek, a mezenchimális eredetű follikuláris DS-ek kivételével a $CD34^+$ hemopoetikus csontvelői őssejtekből (HSC) mieloid és limfoid fejlődési útvonalon egyaránt kialakulhatnak a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF), illetve a citokin Fms-szerű tirozin kináz-3-Ligand (Flt3L) differenciálódást segítő mediátorok hatására. A mieloid fejlődési út során a mieloid progenitor sejtől a magas interferon regulatórikus faktor 8 (IRF8) expressziót mutató granulocita-monocita közös prekurzorokból (GMDP) keletkeznek a csontvelőben a pre-konvencionális vagy klasszikus DS-ek (cDS), a

plazmacitoid DS-ek (pDS) és a tranzicionális DS-ek (tDS), melyek valószínűleg a pDS-ek egyik alpopulációját képezhetik, viszont pontos eredetük még tisztázásra szorul. A pre-cDS-ek transzkriptomikai szinten heterogének és előzetesen elkötelezettek a cDS1 vagy a cDS2 fejlődés irányba. Az alacsony IRF8 expressziót mutató GMDP-ből két másik útvonalon jönnek létre a monociták és a DS3 alcsoport. Végül a monociták két különböző fejlődési útvonalon keresztül differenciálódhatnak makrofágokká vagy monocita-eredetű DS-ekké (moDS). A monocita-DS prekursorokból (MDP) kétféle DS keletkezhet; egyrészt a cDS3, másrészt gyulladásos stimulus hatására moDS. A limfoid fejlődés során szintén kialakulhatnak DS-ek a limfoid progenitorokból (LP), így a multipotens LP-okból keletkezhetnek pre-pDS-ek és a belőlük kialakuló pDS-ek, illetve cDS1-ek is differenciálódnak a limfoid vonalon [6]. Az IRF8 transzkripció faktornak tehát kiemelkedő szerepe van a DS-ek fejlődésében. A domináns funkcióvesztő IRF8 mutációval rendelkező betegekben ugyanis kimutatták, hogy a DS3 kivételével a pDS-ek, a cDS1-ek és a cDS2-ek száma is nagymértékben redukálódott, a teljes funkcióvesztéssel járó IRF8 mutációt mutató betegekben pedig teljesen eltűntek a monociták és a DS-ek összes alcsoportja is [7,8].

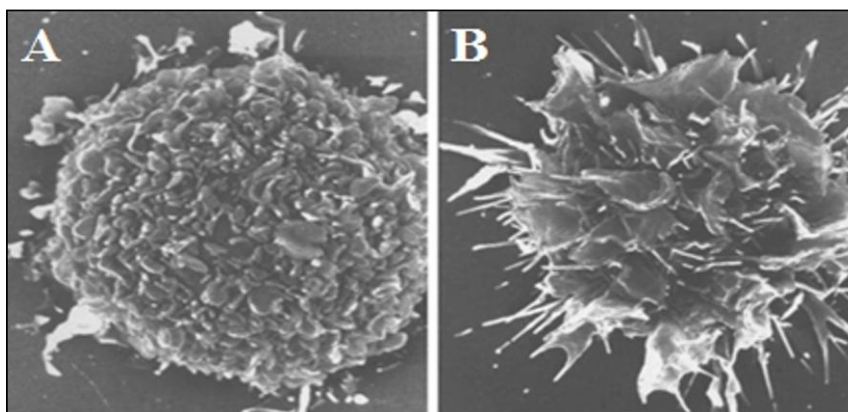
II.2 A vérben lévő DS altípusok specializált funkciói

A vérben keringő DS-ek a mononukleáris sejtek mindössze 0,1-1 %-át teszik ki és a vérben lévő különböző DS alpopulációk meghatározott, specializált immunológiai funkcióval bírnak [9]. A cDS1-eknek az intracelluláris patogének és a tumorok elleni immunválaszban van fontos szerepe. Képesek indukálni a naiv $CD4^+$ T-sejtek T helper (Th) 1 és Th2 irányú polarizációját, valamint elősegítik a citotoxikus $CD8^+$ T-sejtek differenciálódását is. Fő sajátosságuk, hogy hatékony keresztprezentáló sejtek, így kiemelkedő szereppel bírnak a vírusfertőzések és tumorok esetében a naiv citotoxikus $CD8^+$ T-sejtek aktiválásában. A cDS1-ek főként a III-as típusú interferonok (IFN λ) termelésére specializálódtak, szekretálnak TNF- α -át, és alacsony szinten IL-12-t. Fontos szerepet töltenek be a Th1 sejtek és a természetes ölősejtek (NK) aktivációjában. A cDS2-k az immunválaszokat több irányba is polarizálhatják. A szöveti mikrokörnyezet és az antigén fajtájától függően képesek indukálni a naiv $CD4^+$ T-sejtek Th1, Th2 vagy Th17 sejtekké történő polarizálódását is, de magas IL-23 szekréciójuknak köszönhetően a Th17 válaszok elindításában van kiemelkedő szerepük. Továbbá magas aktivin A és OX40-ligand expressziójuk miatt a legeredményesebben indukálják a follikuláris T helper (Tfh) sejteket

is. IL-12-t nagy mennyiségben továbbá IL-1, TNF- α , IL-10 citokineket és IL-8 kemokint választanak ki, de a III-as típusú interferon szekréciójuk alacsony [10,4].

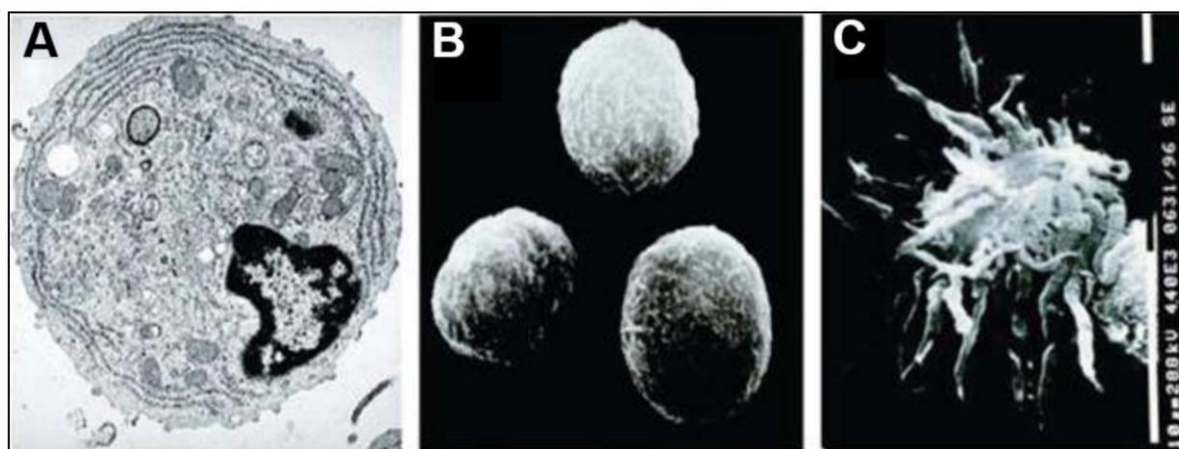
A DS3 alcsoportot Villani és munkatársai 2017-ben azonosították, melyet vegyes monocita-cDS2 fenotípus és transzkripció profil jellemez. A cDS2-khöz hasonlóan képesek IL-12 és IL-23 termelésre, valamint a monocitákhoz hasonlóan nagy mennyiségű IL-1 β szekréció jellemzi ezen DS altípust. Hatékonyan stimulálják a naiv CD4⁺ T-sejteket, főként Th1 és Th17 polarizációt indukálnak, továbbá a naiv CD8⁺ T-sejtek proliferációját stimulálják és segíthetik a szövetrezidens memória T-sejtek kialakulását is [11,4].

Gyulladás során humán monocitákból monocita-eredetű DS-ek (moDS) differenciálódnak, melyek a cDS2-khöz hasonlóan IL-1, TNF- α , IL-12 és IL-23 citokineket szekretálnak főként, valamint szintén hatékonyan indukálhatják a naiv CD4⁺ T-sejtek proliferációját és kontextustól függően a Th1, a Th17, a CD8⁺ T-sejtek és a Tfh sejtek differenciálódását. Továbbá a cDS1-ekhez hasonlóan képesek szolubilis és partikuláris antigének keresztprezentálására is [10,4]. *In vitro* körülmények között CD14⁺ monocitákból különböző citokinek, úgymint GM-CSF és IL-4 jelenlétében is differenciálthatóak moDS-ek, melyekkel kiválóan modellezhetőek az éretlen és érett DS-ek fenotípusos és funkcionális sajátosságai. A GM-CSF és IL-4 jelenlétében végzett *in vitro* differenciáció 3-5. napja után a monociták éretlen moDS-ekké alakulnak át, endocitotikus aktivitásuk magas, de T-sejt aktiváló képességük csekély. Viszont további 1-2 napos stimuláció például Toll-szerű receptor (TLR) ligandok vagy TNF- α hatására érett DS-ekké alakulnak át, melyekre jellemzőek a hosszú elágazó nyúlványok és a hatékony naiv T-sejt aktiváló képesség [12] (1. ábra).



1. ábra. Éretlen DS (A) és érett DS (B) morfológiája. Az éretlen DS-ekkel ellentétben az érett DS-ekre jellemző a hosszú elágazó nyúlványok megléte, mely segíti a T-sejtekkel történő hatékony kontaktust az antigén prezentáció során [12].

A DS alcsoportok közül a pDS-ek szerepe az antivirális immunitásban kulcsfontosságú. Ugyanis professzionális I-es típusú interferon (IFN) termelő sejtekként egyedülálló tulajdonságuk, hogy virális stimulusra nagy mennyiségben és nagyon gyorsan képesek termelni I-es típusú IFN-okat, főként IFN- α -t. Az I-es típusú IFN-ok autokrin és parakrin módon hatva olyan folyamatokat indítanak el, melyek megakadályozzák a vírusok terjedését és elősegítik a vírusok, valamint a vírussal fertőzött sejtek eliminációját [13]. Vírusfertőzést követően a mononukleáris sejtek által termelt I-es típusú IFN-ok 95%-a a pDS-ekből származik, mivel 200–1000-szer több I-es típusú IFN-t képesek termelni, mint bármelyik másik fehérvérsejt vírus expozíció hatására [14]. Eltérően a többi DS altípustól, a humán pDS-ek éretlen alakjára jellemző a plazmasejt morfológia, ugyanis citoszóljuk nagy részét durva felszínű endoplazmatikus retikulum (ER) tölti ki és vese alakú sejtmagjuk excentrikusan helyezkedik el. A pDS-ek éretlen formájára gyakran használatos a plazmacitoid pre-DS elnevezés. Az éretlen pDS-ek aktivációt követően, érett DS-ekké differenciálódva veszik fel a nyúlványos, DS-szerű alakot [15]. A pDS-ek morfológiáját a **2. ábra** mutatja.



2. ábra. A pDS-ek morfológiája. (A) A humán plazmacitoid pre-DS-ek plazmasejtszerű morfológiát mutatnak. Jellemző rájuk az excentrikus sejtmag és a jól fejlett endoplazmatikus retikulum az intenzív protein szintézisnek megfelelően. (B) Pásztázó elektronmikroszkópos felvételen ezek a plazmacitoid pre-DS-ek kerekded, limfoid morfológiát mutató, 8-10 μ m átmérőjű képletekként jelennek meg. (C) Érett, aktivált állapotban azonban a sejtekre a nyúlványos, DS morfológia jellemző [16].

Mint korábban említettük a pDS-ek fejlődési útvonala a csontvelőben nagyon flexibilis, mieloid és limfoid progenitorokból is kialakulhatnak [17]. Folyamatosan termelődnek a csontvelőben és fiziológiás körülmények között főleg a vérben és a másodlagos nyirokszervekben tartózkodnak, a perifériás szövetekben alig találhatóak meg, szemben a cDS-ekkel. Ugyanakkor gyulladásal járó patológiás kondíciók esetében a perifériás szövetekbe is képesek kilépni. Autoimmun kórképekben a periférián is lehet azonosítani a pDS-eket, továbbá allergiás betegek orrnyálkahártyájában, kontakt dermatitises bőrben és tumorokban is nagy számban fordulnak elő [18]. A gyulladt szövetekben nagy mennyiségben felszabaduló kemokin a pDS-eket az antigén bejutás, azaz a gyulladás helyére vonzza, és vírusfertőzések esetén infiltrálódnak a nyálkahártyába vagy a bőrbe [19]. Az antigénprezentáló képességük határfoka elmarad a cDS-ektől, főként csak receptor mediált endocitózis révén vesznek fel exogén antigéneket és alacsony szinten expresszálják a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) fehérjét is, ugyanakkor az endogén antigének bemutatását hatékonyan képesek végezni mind MHC I, mind MHC II molekulákon keresztül [18].

A humán pDS-ek mintázatfelismerő receptorainak (PRR) aktiválódása az IRF és a nukleáris faktor-kappaB (NF- κ B) útvonalon keresztül I-es típusú IFN-ok, illetve pro-inflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-6) és kemokinek (IL-8, CCL3, CCL4, CXCL10) termelődéséhez vezet, melynek révén számos sejttípus funkcióját befolyásolják [19]. Például segítik a mieloid DS-ek differenciálódását, érését és antigén prezentáló kapacitásának hatékonyságát. Indukálják továbbá a Th1 sejt polarizációt, elősegítik a CD8⁺ T-sejtek túlélését és gátolhatják a Th17-típusú válaszokat. Elősegítik a B sejtek izotípus váltását azáltal, hogy a mieloid DS-ekben fokozzák a B-sejt aktiváló faktor (BAFF) és a proliferációt indukáló ligand (APRIL) gének expresszióját [20]. A pDS-ek károsodott I-es típusú IFN termelő képessége növelheti a vírusfertőzések kockázatát és a tumor progressziót, ugyanakkor túlműködésük autoimmun kórképek kialakulásának kedvez [21].

Mivel a pDS-ek gyakorisága a vérben rendkívül alacsony, mindösszesen a perifériás vér mononukleáris sejtek (PBMC) 0,2-0,8%-a, több kutatócsoport is próbálkozott pDS sejtvonalakat létrehozni leukémiás primer pDS-ekből, de ezek nem voltak képesek IFN-okat termelni. Ugyanakkor a nemrégiben létrehozott GEN2.2 pDS sejtvonal, melyet munkacsoportunk is alkalmaz a kísérletek során, a primer humán pDS-ekhez hasonló

génexpressziós profilt mutat és mind fenotípusosan, és mind funkcionálisan megegyezik velük, így releváns sejtmodellként szolgál a pDS-ek biológiájának tanulmányozásához [22].

2017-ben azonosítottak a DS-ek egyik legújabb populációját, az AXL⁺ SIGLEC6⁺ tDS-eket, melyek a CD123⁺ DS-ek alpopulációjának tekinthetők. A tDS-ek vegyes pDS-cDS transzkriptommal és fenotípussal jellemezhetők, de funkcionálisan közelebb állnak a cDS2-khöz, képesek cDS2-vé differenciálódni viszont nem szekretálnak I-es típusú IFN-okat, de a CD4⁺ T-sejteket hatékonyan stimulálják [11,23,24]. A tDS-ek specializált funkciói kiegészítik az összes többi DS alpopuláció effektor funkcióit, biztosítva ezáltal a hatékony immunválaszt. A vérben lévő DS altípusok többsége fiziológiás körülmények között is folyamatosan kivándorol a perifériás szövetekbe, ahol további differenciálódáson mennek keresztül és az agy kivételével az összes szövetben kimutathatók. A perifériás szövetekben nem osztódnak, hanem folyamatosan pótlódnak, mert viszonylag rövid *in vivo* életidővel rendelkeznek (kb. 3-5 nap). A perifériás szövetekben és a nyirokszervekben található DS-ek prekursorai valószínűleg tehát a vérben található DS alpopulációk, melyek között szöveti lokalizációjuk alapján megkülönböztethetünk migrációs és szövet rezidens DS-eket is [17,25]. A nyirokcsomókban előforduló DS-ek mintegy fele rezidens DS, a másik fele az érett fenotípust mutató, a nyirokerekben keresztül érkező DS-ek, amik a periférián felvett antigéneket szállítják be a nyirokcsomókba, ahol az antigének bemutatása zajlik a T-sejtek felé [10].

II.3 A DS-ek érése és differenciálódása

A csontvelőből való kilépés után a DS-ek a vérben keringenek, főként éretlen állapotban és érett DS-ekké történő differenciálódásuk a limfoid és nem limfoid szövetekbe való kilépés után történhet meg. Fiziológiás körülmények között a DS-ek nyugalmi vagy éretlen állapotára jellemző az antigén prezentáló molekulák, azaz az MHC molekulák alacsony sejtfelszíni expressziója, továbbá a kostimulációs (CD40, CD80/B7-1, CD86/B7-2), illetve az adhézións molekulák (CD54/ICAM1, CD58/LFA-3) marginális kifejeződése és inaktív állapota. Másfelől viszont az éretlen DS-ek hatékonyan képesek az antigének felismerésére, és a környezetükből pinocitózissal, receptor mediált endocitózissal vagy fagocitózissal folyamatosan veszik fel az oldott részecskéket, valamint a megváltozott vagy apoptotikus sejteket [26].

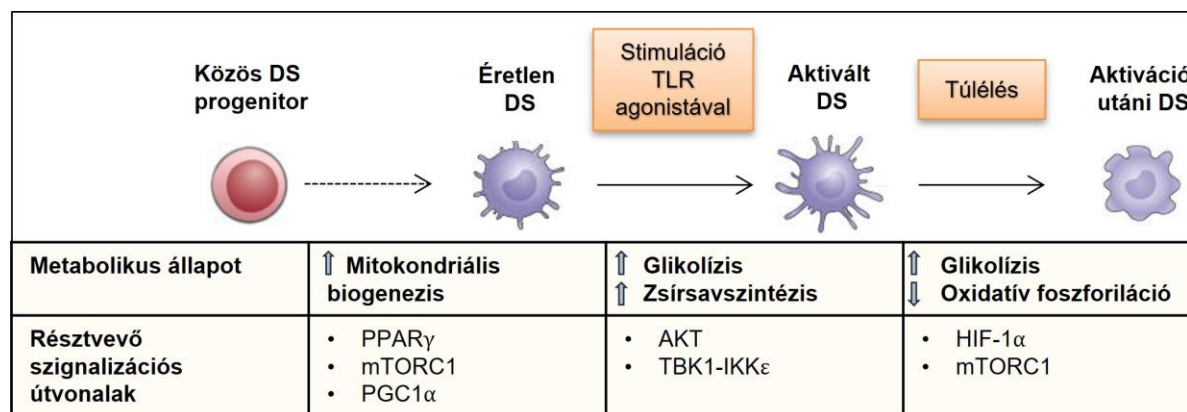
A DS-ek a veszély szignálok, úgymint például a mikrobiális eredetű patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP), a sérült szövetekből felszabaduló veszély/sérülés-asszociált molekuláris mintázatok (DAMP), allergén komponensek vagy egyéb a szervezetbe kerülő idegen anyagok hatására érési folyamaton mennek keresztül. Az érési folyamat során megváltozik a DS-ek morfológiája, a sejtek hosszú elágazó nyúlványokat növesztenek és fagocitáló képességük csökken, viszont fokozódik a felvett anyagok lebontása, az MHC molekulák szintézise és az antigén prezentációhoz szükséges antigén-MHC komplexek sejt felszínre szállítása. Az endogén eredetű peptidek az MHC I. molekulákon keresztül a CD8⁺ citotoxikus T-sejtek (Tc) számára kerülnek majd bemutatásra, míg az extracelluláris térből bekebelezett antigénekből származó, exogén eredetű peptidek CD4⁺ helper T-sejtek számára lesznek prezentálva. Az MHC molekulák fokozott expressziója mellett az érett DS-ek felszínén megnő a T-sejt aktivációt elősegítő, kostimuláló és adhéziós molekulák kifejeződése is. Továbbá megnő a DS-ek C-C kemokin receptor 7 (CCR7) expressziója, ami segíti a DS-ek nyirokcsomókba történő vándorlását. A nyirokcsomókban az érett, teljes mértékben differenciálódott DS-ek a leghatékonyabb hivatásos APS-ek, amelyek sejt felszíni molekuláik révén közvetlen kapcsolatot tudnak teremteni az antigén specifikus, naiv segítő és ölü T-sejtekkel [26,27].

A DS-ek érési folyamatait genom-szintű analízissel vizsgálva megállapították, hogy a DS-ek transzkripciós átprogramozáson mennek keresztül különböző aktivációs szignálok hatására, amelyben a NF- κ B és az IRF3 és IRF7 által szabályozott jelátviteli útvonalak erősen érintettek. Ezen útvonalak aktiválódása révén az érett, aktivált DS-ek nagy mennyiségű citokint, kemokint és lipid mediátort termelnek, melyek az immunválaszok hatékonyságát növelik [28].

Ugyanakkor a DS-ek éréséhez kapcsolódó biológiai funkciók aktivizálásához a sejteknek szükséges anyagcsere folyamataikat is újra programozni [29]. Kritikus jelentőségű, hogy a DS-ek képesek legyenek gyorsan átváltani a nyugalmi állapotból az aktivált állapotba, hogy a lehető leggyorsabban tudjanak válaszolni a fertőzéssel vagy sejt károsodással kapcsolatos környezeti veszélyjelzésekre. Aktiváció során a DS-ek a lipidek β -oxidációja által táplált mitokondriális oxidatív foszforilációról (OXPHOS) aerob glikolízisre váltanak át, ami az adenzin-trifoszfát (ATP) gyors forrása. Továbbá bekapcsolja a pentóz-foszfát útvonalat (PPP) is a nukleotidok bioszintézisének fokozása érdekében, a keletkező nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát (NADPH) pedig fokozza a reaktív oxigén

származékok (ROS) képződését a DS-ekben, ami elengedhetetlen az antigén prezentációhoz [30].

Az aktivált DS-ekben a metabolikus átprogramozás elsőként a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát-3 kináz (PI3K) protein kináz B (Akt) útvonal aktivációjával asszociál, amit az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) antagonizál [31]. Megállapították, hogy a PI3K-
rapamycin emlős célpont (mTOR) jelátvitel is hozzájárul az Akt foszforilációjához a DS-
ekben az aktiváció során, de a TANK-kötő kináz 1-et (TBK1) és a I κ B-kináz ϵ -t (IKK ϵ)
azonosították a legfontosabb kinázként az Akt szabályozásában. A DS-ek glikolízise az
aktiválódásuk későbbi szakaszaiban mTORC1-HIF-1 α útvonal függő. Az mTORC1
indukálja a HIF-1 α és a myelocytomatosis onkogén (MYC) transzkripció faktorokat,
melyek aktivitása fokozza a glükóz transzporter 1 (GLUT1) expresszióját, valamint a
hexokináz 2 (HK2), laktát dehidrogenáz A (LDHA) glikolitikus gének kifejeződését. A DS-
ek aktivált állapotához kapcsolódó fokozottabb glikolízis támogatja zsírsavszintézist, az
pedig segíti a fehérjeszintézisben és szekrécióban részt vevő ER és Golgi méretének
növekedését [29,32,33]. A DS-ek éréséhez és aktivációjához szükséges metabolikus
változásokat és szignalizációs útvonal aktivitásokat a **3. ábrán** foglaltam össze.



3. ábra. A DS-ek fejlődéséhez, nyugalmi állapotához és az aktiválódásához kapcsolt anyagszere változások. A DS-ekben a progenitor sejtekből történő fejlődésük során a mitokondriális biogenezis dominál, melyet a PPAR γ , a PGC1 α és az mTOR útvonal aktivitása támogat. Az éretlen DS-ek a zsírsav-oxidációt használják alapvető metabolikus folyamatként. A DS-ek TLR agonisták általi aktiválása a glikolízis és a kapcsolódó pentózfoszfát útvonalon a fluxus gyors növekedéséhez vezet, amivel együtt nő a zsírsavszintézis is. Ebben az állapotban a PI3K/Akt, és a TBK1-IKK ϵ útvonalak a legaktívabbak a DS-ekben. Aktiválást követően a DS-ekben a glikolízis dominál, melyet az mTOR komplexek és a HIF-1 α szabályoznak. PPAR γ : peroxiszóma proliferától aktivált receptor- γ , PGC1 α : PPAR γ koaktivátor 1 α , mTOR: rapamycin emlős célpont, TLR: Toll-szerű receptor, PI3K: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát-3 kináz, Akt: protein kináz B, TBK1: TANK-kötő kináz 1, IKK ϵ : I κ B-kináz ϵ , HIF-1 α : hypoxia indukálta faktor-1 α [29].

II.4 A DS-ek mintázatfelismerő receptorai (PRR)

A veleszületett immunrendszerhez tartozó sejtek PRR-ekkel képesek detektálni a mikroorganizmusokból származó PAMP-okat, vagy az endogén eredetű DAMP-okat, ezek lehetnek idegen vagy saját eredetűek, amik főként szövetsérülések nyomán szabadulnak fel [34]. A PAMP-ok olyan molekuláris mintázatok, amelyek a patogének túléléséhez nélkülözhetetlenek, ezért szigorúan megőrződtek az evolúció során. Ilyenek például a Gram negatív baktériumok sejtfalában található endotoxin, azaz az LPS, a bakteriális lipoproteinek, a peptidoglikánok, a metilálatlan citozin-foszfát-guanin (CpG) motívumokat tartalmazó bakteriális dezoxiribonukleinsav (DNS) fragmentumok vagy a dupla szálú ribonukleinsavak (dsRNS) [35]. A PRR-ek a csíravonalban kódoltak, az evolúció során a patogének elleni védekezés eredményeként alakultak ki és főként olyan sejteken funkcionálnak, amelyek elsőként találkoznak a szervezetbe jutó kórokozókkal. Ezek a receptorok rendkívül sok félék és számos molekuláris mintázatot képesek felismerni, majd felismerést követően számos szignalizációs útvonalat képesek aktiválni, így eltérő immunválaszok kialakulását eredményezhetik. A különböző PRR-ek megjelenhetnek a sejtek felszínén, illetve intracellulárisan is, valamint nem sejthez kapcsolt, azaz szolubilis formában is léteznek [36,37]. A legjelentősebb PRR-eket a következő fejezetekben részletezem.

II.4.1 A DS-ek Toll-szerű receptorai (TLR)

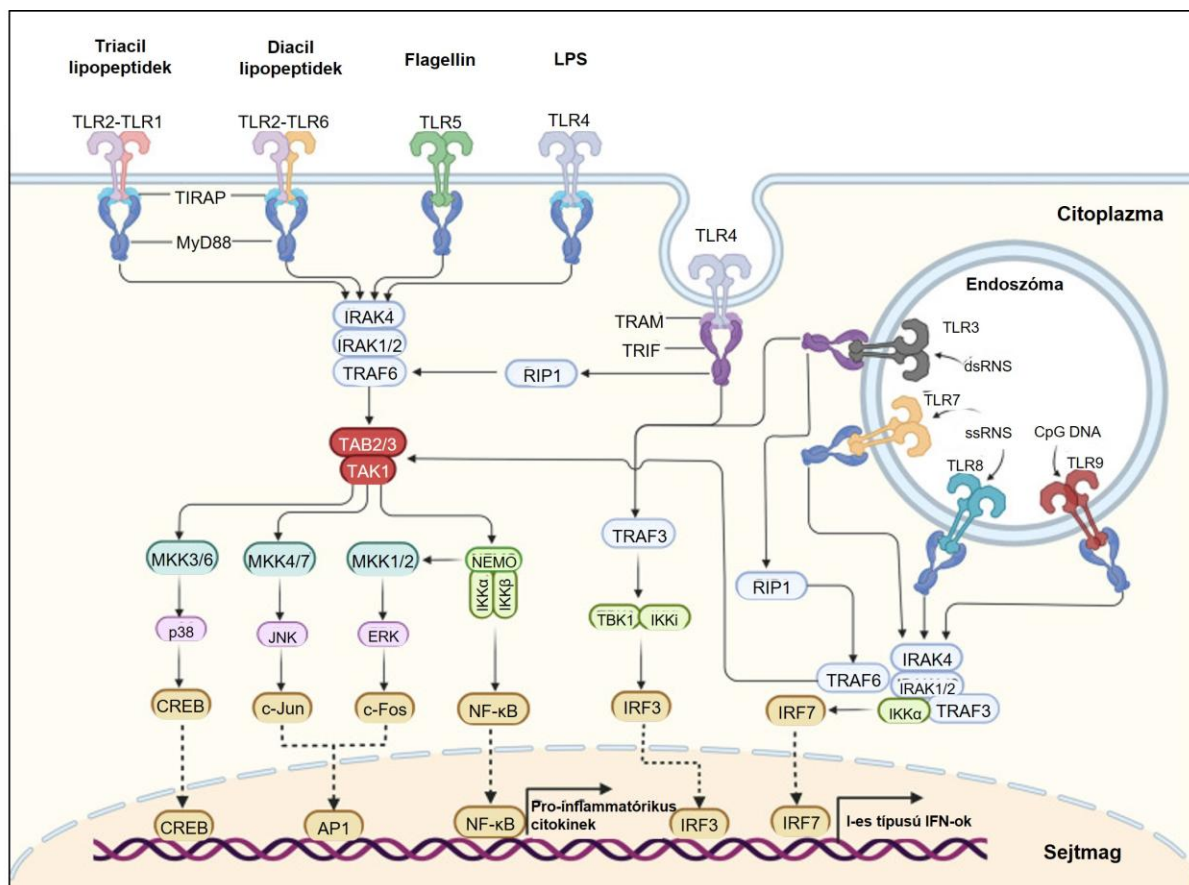
A mikrobiális struktúrák felismerésében kiemelkedő szerepe van a transzmembrán TLR-eknek, melyeknek emlősökben 13 fajtáját, emberben pedig 10 különböző fajtáját azonosították eddig. A TLR-ek I-es típusú transzmembrán receptorok három fő alegységből állnak: a ligandumok megkötéséért felelős leucinban gazdag ismétlődéseket tartalmazó doménből, egy rövid transzmembrán régióból, valamint egy konzervatív, a humán interleukin-1 receptorral (IL-1R) homológ Toll/IL-1R (TIR) jeltovábbító doménből [38,39]. A TLR-ek egy része a sejtfelszínen, a plazmamembránban lokalizálódik (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) és főleg a mikrobiális sejtfal komponenseket ismeri fel. A TLR-ek másik része (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) az endoszómákban lokalizálódik és főként mikrobiális vagy saját eredetű nukleinsavak felismerésére specializálódtak [40]. A TLR család tagjai összességében a patogének minden fajtáját képesek detektálni, illetve egy adott kórokozót több különböző TLR receptor is felismerheti a különböző PAMP-okon

keresztül [38,41-44]. Ráadásul a TLR-ek nem csak PAMP-okat, hanem saját eredetű veszély szignálokat is képesek érzékelni és egy TLR receptornak több ligandja is lehet. Például a TLR4 homodimer elsődlegesen a Gram negatív baktériumok LPS-ét ismeri fel és köti meg, de a gombákból származó mannánokat, parazitákból származó glikoinozitol-foszfolipideket és a vírusok burokfehérjéit is képes detektálni. Továbbá a patogén eredetű PAMP-ok mellett a saját DAMP-ok érzékelésére is képes, melyek főként szövetkárosodások során válnak veszély szignálokká, úgymint például hő-sokk fehérjék, fibronectin és fibrinogén [38].

A felismerést követően a TLR-eken keresztüli jelátvitelt a receptorok dimerizációja indítja el, a résztvevő adapter fehérjék alapján megkülönböztetünk mielőid differenciálódási primer válasz fehérje 88 (MyD88) függő és MyD88 független szignalizációs útvonalakat. A MyD88 függő útvonalat a TLR3-on kívül minden TLR használja. A MyD88 független útvonalon a TRIF-kapcsolt adapter molekula (TRAM más néven TICAM-2) kapcsolódik a TIR-domént tartalmazó IFN- β -át indukáló adapter fehérjéhez (TRIF) [38,45]. A MyD88 függő útvonal esetében a MyD88 downstream molekulákat toboroz a TIR domének homofil kölcsönhatásán keresztül az úgynevezett „myddosoma” létrehozásához, mely a MyD88 molekulán kívül az IL-1-receptorhoz (IL-1R) kapcsolt kinázok (IRAK) közül az IRAK4-et és IRAK1/2-t tartalmazza. Az IRAK4 foszforilálja az IRAK1-et, mely aktiválja az E3 ubiquitin ligázt, a tumornekrózis-faktor receptorhoz kapcsolt faktor 6-ot (TRAF6). A TRAF6 aktiválja a transzformáló növekedési faktor- β -aktivált kináz 1-et (TAK1), ami tovább foszforilálja az I κ B kináz-kináz (IKK) komplex katalitikusan aktív alegységeit az (IKK- β -t és IKK- α), míg az IKK- γ (NEMO) alegység szabályozó funkciót tölt be. Az NF- κ B fehérjék a citoplazmában inaktív formában az inhibitor kappa-B (I κ B) fehérjékkal dimert alkotva vannak jelen az aktivált IKK komplex közvetíti az I κ B- α foszforilációját, mely ubiquitinálódik, majd szelektíven és gyorsan lebomlik. Ez lehetővé teszi az aktív NF- κ B transzkripciós faktor számára a citoplazmából nukleuszba történő transzlokációt és a célgénjeinek az átíródását, ami IL-6, IL-12 és TNF- α pro-inflammatórikus citokinek termelődéséhez vezethet. Az NF- κ B aktivációjában a MyD88-cal, vagy TRAF-6-tal kapcsolódó PI3K is fontos szerepet játszik, amely az Akt foszforilációján keresztül erősíti a folyamatot. A TAK1 egyidejűleg a mitogén aktivált protein kinázt (MAPK) is foszforilálja, ami a p38, a c-Jun amino-terminális protein kináz (JNK) és az extracelluláris szignál-szabályozott kináz (ERK1/2) aktiválásához vezet, és egyéb fontos transzkripciós faktorok,

úgy mint az aktivátor fehérje 1 (AP1) és a ciklikus AMP válaszadó elem-kötő (CREB) aktivációját eredményezi [38,46-48].

A TRIF útvonalon az aktiválódott receptorok közvetlenül kapcsolódnak a TRIF adapter fehérjéhez, mely elősegíti az IKK ϵ és a TBK1 TRAF3 függő aktiválását. Ezek a kinázok foszforilálják az IRF3-at és IRF7-et, amelyek homodimerizálódnak, a sejtmagba transzlokálódnak és számos célgénjüknek indukálják a transzkripcióját, ami főleg I-es típusú IFN-ok (INF α , INF β) termelődéséhez vezet. A MyD88 független útvonalon a TRIF a TRAF-6-on keresztül az NF- κ B aktivációját is kiválthatja [49-51]. A TLR-ek fajtáit, lokalizációját, ligandumait és a receptorokhoz kapcsolt jelátviteli útvonalakat a **4. ábra** foglalja össze.



4. ábra. A TLR-ek lokalizációja, ligandumai és a hozzájuk kapcsolt jelátviteli utak. A legtöbb TLR ligand kötést követően homodimereket képez, míg a TLR2 heterodimereket alkothat a TLR1-vel és elsődlegesen triacilált lipoproteinek/lipopeptideket ismer fel, vagy dimerizálódhat a TLR6-tal és diacilált lipoproteinek/lipopeptideket érzékel. A TLR4 elsődlegesen a Gram negatív baktériumok LPS-ét, a TLR5 a különböző baktériumok flagellinjét ismerik fel. A TLR2-TLR1, a TLR2-TLR6, a TLR4 és a TLR5 a sejtfelszínen, a plazmamembránon lokalizálódik. A TLR3, a TLR7, a TLR8 és a TLR9 az endoszómákban helyezkednek el és a különböző mikroorganizmusok vagy a saját nukleinsavak felismerésére specializálódtak. Aktiválás után a receptorok MyD88 függő vagy független (TRIF) jelátviteli utakat indíthatnak el, melyek különböző transzkripciós faktorokat aktiválnak, és gyulladást segítő citokinek, valamint I-es típusú IFN-ok termelődését indukálják. AP1: aktivátor protein 1, CpG: citozin-foszfát-guanin, CREB: ciklikus AMP válaszadó elem-kötő, ERK: extracelluláris szignál-szabályozott kináz, IFN: interferon, IKK: IκB kináz, IRAK: IL-1-receptorhoz (IL-1R) kapcsolt kináz, IRF 3/7: interferon regulatórikus faktor 3/7, JNK: c-Jun amino-terminális protein kináz, LPS: lipopoliszacharid, MAPK: mitogén aktivált protein kináz (MAPK), MyD88: mieloid differenciálódási primer válasz fehérje 88, NF-κB: nukleáris faktor-kappa B, TAK1:transzformáló növekedési faktor-β-aktivált kináz 1, TBK1: TANK-kötő kináz 1, TLR: Toll-szerű receptor, TRAF 3/6: TNF receptorhoz kapcsolt faktor 3/6, TRIF: TIR-domént tartalmazó adapter indukáló interferon β [52].

II.4.2 A DS-ek szolubilis citoszólikus szenzorai

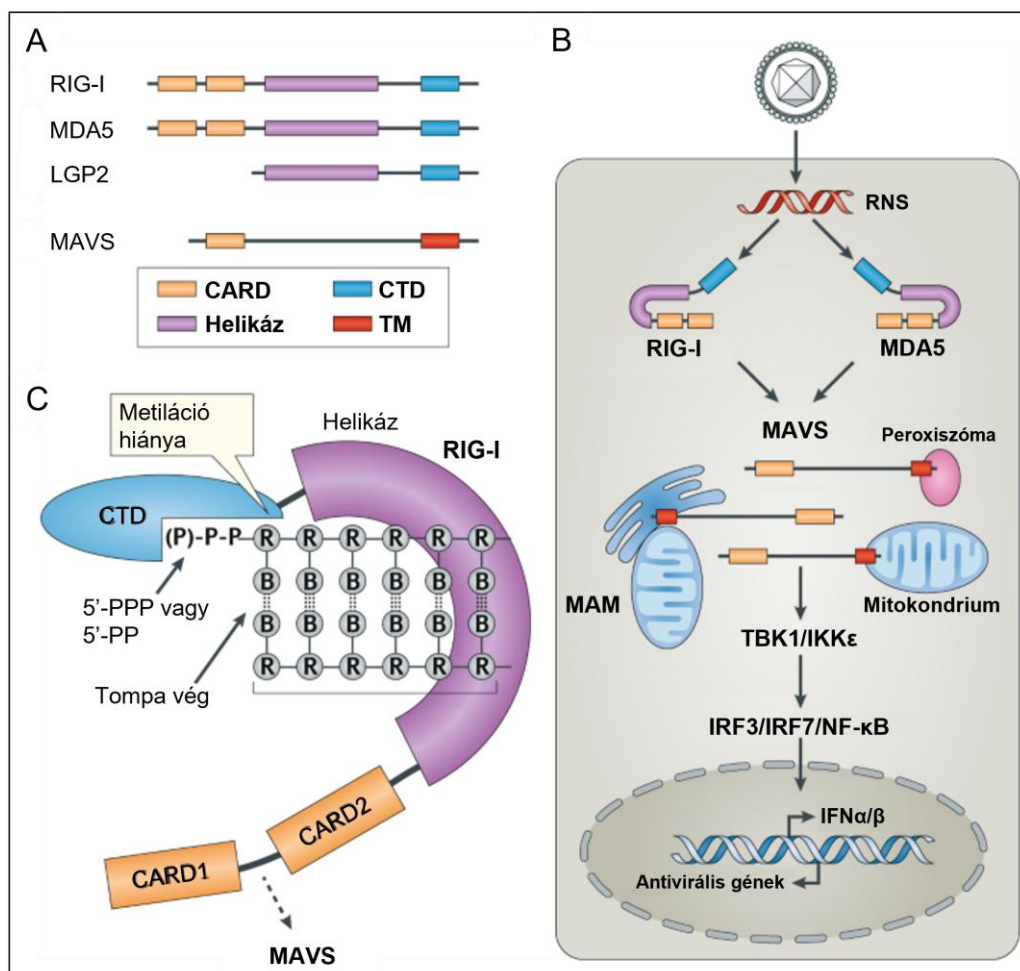
Számos patogén fertőzés során a kórokozók bejuthatnak a gazdasejt citoplazmájába és ott replikálódhatnak. A vírusok génjei is gyakran a gazdasejt citoplazmájában íródnak át, illetve az új virionok is ott szerelődnek össze. A DS-ek sokféle citoplazmatikus receptort is expresszálnak, melyek főként a patogének nukleinsavainak felismerésére specializálódtak. Ilyenek a citoplazmatikus retinsav-indukálható gén (RIG)-I-szerű receptorok (RLR), a melanomában hiányzó fehérje 2 (AIM2) -szerű receptorok (ALR), továbbá az interferon gén stimulátor (STING) aktiváló ciklikus GMP-AMP szintáz (cGAS) receptorok, és az IFN-regulatórikus faktor DNS dependens aktivátora (DAI), illetve a DDX41 [53,54]. Az RLR-ek a citoszólikus RNS-t, míg az ALR-ek és a STING-en keresztül szignalizáló fehérjék a citoszólikus DNS-t ismerik fel. A mitokondriális antivirális szignalizációs fehérjét (MAVS) és a STING adapter proteint használó citoszólikus PRR-ek főként az IRF3-at és az IRF7-et aktiválják az NF- κ B transzkripció faktoron kívül, és az I-es típusú IFN-ok, illetve a pro-inflammatórikus citokinek termelését váltják ki. Az AIM2 aktiválódása pedig az IL-1 családba tartozó citokinek felszabadulását eredményezheti [55,56]. A nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű citoszólikus receptorok (NLR-ek) egyes típusai is képesek lehetnek a citoszólikus nukleinsavak felismerésére, azonban ezen receptoroknak nem ez a fő funkciója és aktivációjuk kimenetele is eltérő. Az NLR család pirin domént tartalmazó fehérjei (NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRC4) például képesek létrehozni nagy multiprotein komplexeket, úgynevezett inflammaszómákat, amelyek elősegítik az IL-1 β és IL-18 gyulladásos citokinek felszabadulását kaszpáz-1 függő módon. Más NLR-ek intracelluláris jelátviteli kaszkádok pozitív vagy negatív szabályozójaként működnek, mint például a NOD1, NOD2, NLRX1 és NLRC5. Továbbá az NLR-ek egy specifikus alcsoportja, beleértve az NLRC5-öt és a II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex transzaktivátort (CIITA) szabályozhatják az MHC I és MHC II gének transzkripcióját, fokozva ezáltal az antigén prezentációt. A NOD1 és a NOD2 pedig képesek autofagoszómák képződését indukálni, amivel segítik az intracelluláris patogének eltávolítását, illetve az NLR-ek egy specifikus alcsoportja, az úgynevezett reprodukív NLR-ek fontos szabályozó funkciót tölthetnek be az embriogenezis és a szaporodás folyamataiban egyaránt [57].

A citoszólikus nukleinsav szenzorok közül munkacsoportunk elsősorban az RLR-ek funkcióinak tanulmányozásával foglalkozik. Korábban munkacsoportunk publikálta, hogy a vérben keringő cDS-ekhez hasonlóan a moDS-ek is konstitutívan expresszálják az RLR-eket,

szemben a pDS-ekkel, amikben az RLR-ek két fajtája, a RIG-I és az melanoma differenciálódáshoz kapcsolódó fehérje 5 (MDA5) nem, vagy csak nagyon alacsony szinten expresszálódik. Ugyanakkor a pDS-ekben konstitutívan kifejeződő endoszomális TLR-eken (TLR7, TLR9) keresztüli stimuláció mellett, hogy nagymennyiségű I-es típusú IFN termelést eredményez, nagymértékben képes indukálni az RLR-ek kifejeződését is az autokrin I-es típusú IFN hatásoktól függetlenül. Ezen megfigyelések azt mutatják, hogy bár az RLR-ek hiányoznak a nyugvó pDS-ekből, vírusfertőzések esetén indukálhatóak, így hozzájárulhatnak a pDS-ek I-es típusú IFN-válaszainak késői fázisaihoz [58,59].

Az RLR-ek főleg a vírusreplikáció során keletkező RNS fragmenteket érzékelik, így aktivációjukhoz szükséges a vírusok aktív, sejten belüli replikációja. A RIG-I inkább rövidebb (<2000 bázispár) egy vagy kétszálú RNS-t ismer fel, amelyek az 5' végükön trifoszfát csoportot tartalmaznak (5'ppp), míg az MDA5 túlnyomórészt hosszú kétszálú RNS-eket érzékel [60-62]. A RIG-I és az MDA5 számos szerkezeti hasonlóságot mutat, mindkét receptor három különálló doménből épül fel. Az egyik a kaspáz aktivációs és toborzó domén (CARD), mely egy tandem domén az N-terminális régióban. A központi domén egy DExD/H box RNS helikáz domén, amely képes hidrolizálni az ATP-t, valamint megkötni és esetlegesen letékerni a felismerendő RNS-t. A harmadik eleme ezen receptoroknak a C-terminális doménbe (CTD) ágyazott C-terminális represszor domén (RD), amely a RIG-I esetében részt vesz az autoregulációban is. Az RLR család harmadik tagja, a genetikai és fiziológiai laboratórium 2 (LGP2), ami bár szintén hasonló szerkezetet mutat, ezen fehérjékből hiányoznak az N-terminális CARD-ok és jelenleg úgy gondolják, hogy a RIG-I és MDA5 jelátvitel szabályozójaként funkcionálnak [62-64].

A RIG-I és az MDA5 a citoplazmatikus RNS-ek felismerésével aktiválódnak és a CARD domének oligomerizációja után kölcsönhatásba lépnek a MAVS adapter proteinnel. A MAVS RIG-I és MDA5 általi aktiválása az IKK ϵ és a TBK1 jelátviteli molekulákon keresztül az IRF3 és IRF7 transzkripciós faktorok foszforilációját indukálja, melyek a foszforilációt követően a sejtmagba transzlokálódnak és az IFN α és IFN β gének expresszióját fokozzák. A RIG-I/MDA5-MAVS komplex aktiválja az IKK-komplexet is, ami az NF- κ B útvonalon keresztül pro-inflammatorikus citokinek termelését váltja ki [65,66] **(5. ábra)**.



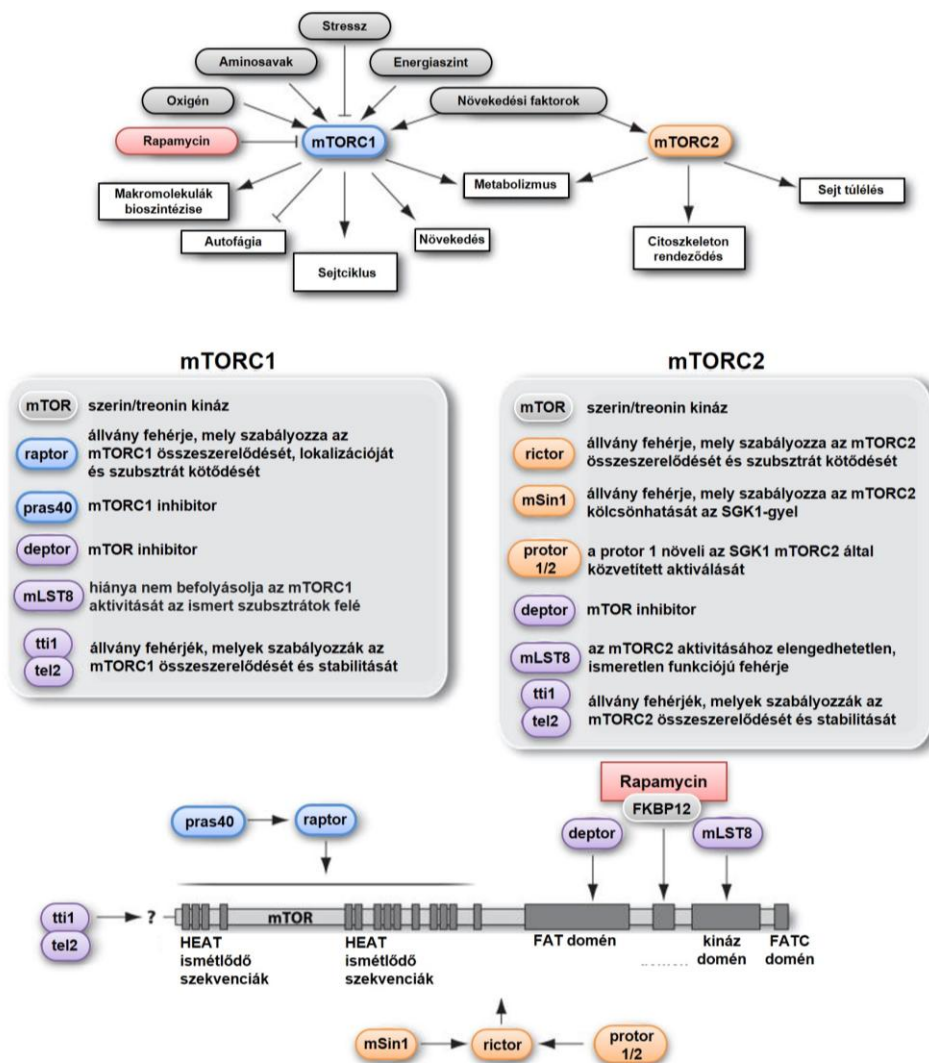
5. ábra. Az RLR-ek szerkezete és jelátviteli útvonala. (A) RLR-ek szerkezete: az RLR család mindhárom tagja egy központi helikáz doménnel rendelkezik, továbbá egy RNS-kötő CTD doménnel. A RIG-I és az MDA5 két toborzó CARD domént tartalmaz. Az LGP2-nek ugyanakkor nincs CARD doménje. A MAVS adapter fehérje CARD-dal, valamint C-terminális (TM) rendelkezik. (B) RLR-ek jelátvitel: A RIG-I és az MDA5 virális RNS stimulus hatására konformáció változáson megy keresztül, CARD doménjeik multimerizálódnak, ami lehetővé teszi a CARD-CARD asszociációt a MAVS-sal. A MAVS transzmembrán domén TM-jével a mitokondriumhoz, a MAM-hoz és a peroxisómákhoz van rögzítve és a jelet a TBK1-hez és az IKKε-hez továbbítja, ami az IRF3-at és IRF7-et aktiválva IFNα/β termelést indukál, valamint NF-κB-t aktiválva egyéb gyulladásos citokinek kifejeződését segíti. (C) RLR-ek ligand kötése: A RIG-I aktív konformációt felvéve egy immunstimuláló RNS-hez kötődik, ami az 5' végén difoszfát vagy trifoszfát csoportot tartalmaz és a saját nukleinsavakkal ellentétben metilátlan formában van, mely veszély szignálnak minősül a sejt számára. CARD: kaszpáz aktivációs és toborzó domén, CTD: C-terminális domén, IFNα/β: interferon α/β, IKKε: IκB-kináz ε, IRF 3/7: interferon regulatórikus faktor3/7, LGP2: genetikai és fiziológiai laboratórium 2, MAM: mitokondrium-asszociált membrán, MDA5: melanoma differenciálódáshoz kapcsolódó fehérje 5, MAVS: mitokondriális antivirális szignalizációs fehérje, NF-κB: nukleáris faktor-kappa B, RD: C-terminális represszor domén, RIG-I: retinsav-indukálható gén I receptor, RLR: retinsav-indukálható gén I-szerű receptor, TM: transzmembrán, TBK1: TANK-kötő kináz 1 [66].

II.5 A DS funkciók szabályozása endogén módon

II.5.1 Az mTOR jelátviteli útvonal a DS-ekben

Korábban széles körben tanulmányozták az mTOR szerepét a DS-ek biológiájában és megállapították, hogy az mTOR fontos szerepet játszik a veleszületett immunsejtek funkcióinak szabályozásában, így köztük a DS-ek fejlődésének, differenciálódásának és működésének koordinálásában [67,68]. Az aktivált veleszületett immunsejtek megváltoztatják sejt morfológiájukat, új szöveti helyszínekre vándorolnak. Gyorsan alkalmazkodnak a megváltozott környezethez, továbbá nagy mennyiségű citokint, kemokint és lipid mediátorokat képesek előállítani. Ezen energia igényes folyamatokat és a DS-ek PRR-ek által indukált immunológiai válaszait több mechanizmus is szabályozza, melyek közül kiemelkedő az mTOR jelátviteli útvonal szerepe [69]. Számos tanulmányban az mTOR komplexet a DS funkciók központi endogén szabályozójaként azonosították, ezt támasztják alá azon megfigyelések is, miszerint számos vírus evolválódott arra, hogy befolyásolni tudja a sejtek PI3K/Akt/mTOR jelátviteli útvonalait, átvéve a gazdasejt feletti uralmat és elősegítve a gazda sejt túlélését és a vírusok replikációját [70].

Az mTOR a sejtekben két különböző multiprotein komplexben, az mTORC1-ben és mTORC2-ben fordul elő. Az mTOR nevét a *Streptomyces hygroscopicus* baktérium fajból izolált gátlószeréről, az eredetileg gombaellenes, majd később immunszuppresszív hatóanyagként jellemzett rapamycinről kapta [71]. Az mTOR egy 289 kilodaltonos (kDa) szerin/treonin protein kináz, mely szerkezetileg az N-terminális részen található α -hélixekből álló ismétlődő szekvenciákból (HEAT-repeats) és négy konzervált doménből épül fel. Ezen konzervált domének a FAT-domén, a kináz-domén (KD), az FK506-rapamycin kötő fehérje és szabályozó-domén (FRB/PRD), valamint a FAT C-terminális domén (FATC). A FAT, FRB/PRD, és FATC-domének szabályozzák a kináz-domén aktivitását. A FAT-domén C-terminális felőli vége van a legközelebb a kináz-doménhez, itt helyezkedik el az FRB/PRD domén, ahova a rapamycin az intracelluláris FK506-kötő fehérje 12-vel (FKBP12) komplexben kötődni képes. A rapamycin az mTOR erős allosztérikus inhibitoraként gátolja az mTORC1 downstream jelátvitelt, miközben nem befolyásolja az mTORC2 aktivitását. Az új ATP-kompetitív katalitikus inhibitorok például AZD8055, ADZ2014, Torin-1 és PP242 az ATP kötő helyet célozzák meg az mTOR doménben, így képesek gátolni mindkét mTOR komplex aktivitását [72,73]. Az mTORC1 és mTORC2 komplexek mind szerkezetükben, mind funkcióikban eltérőek (6. ábra).



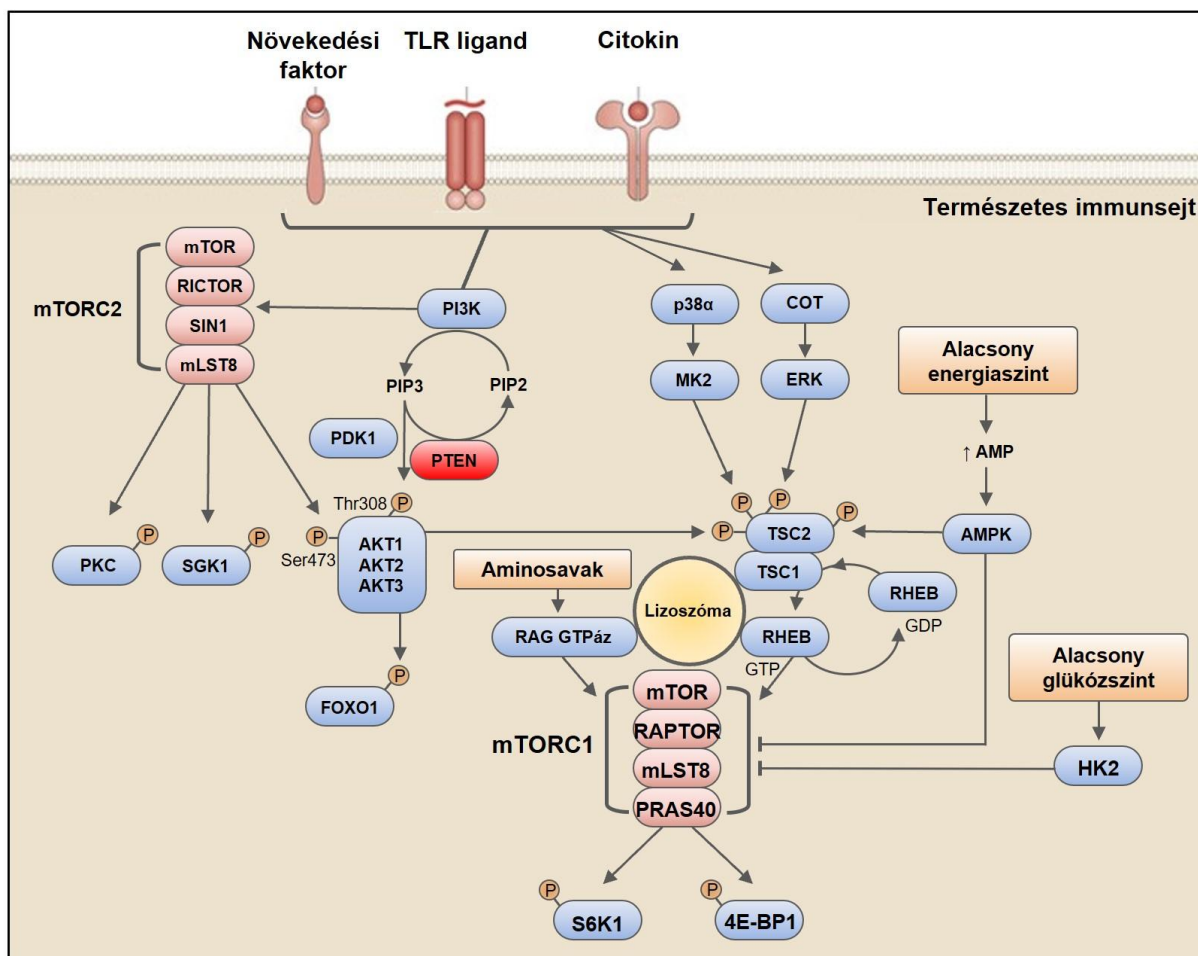
6. ábra. Az mTORC1 és az mTORC2 komplexek szerkezete és funkciói. A komplexeket aktiváló tényezőket és a komplexek funkcióit az ábra felső, a komplexeket alkotó fehérjéket az ábra középső, az mTOR szerkezetét az ábra alsó része szemlélteti [72].

A komplexek az mTOR-on kívül további fehérjéket tartalmaznak, a DEP domént tartalmazó mTOR kölcsönhatású fehérje (Depror) mindkét komplexben gátolja az mTOR működését, ugyanakkor az emlős stressz-aktivált protein kináz kölcsönhatásba lépő fehérje (mLST8) segíti a komplexek aktivitását. Az mTORC1-re specifikus az mTOR szabályozásához kapcsolódó fehérje (Raptor), mely kötőhelyeket biztosít a célfehérjéknek, a riboszomális S6 kináz 1-nek (S6K1) és az eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje 1-nek (4E-BP1). A prolin gazdag Akt szubsztrát (PRAS40) a Raptorhoz kapcsolódva gátolja az mTORC1 aktivitását, azonban az Akt által foszforilálódva leválik a Raptorról és a komplex felszabadul a gátlás alól. Az mTORC2-höz kapcsolódó speciális fehérje, az mTOR

rapamycin-intenzív társa (Rictor) az mSin1-vel az Akt foszforilálásának a szabályozását végzik, míg a Protor1/2 fehérje szerepe kevésbé ismert az mTORC2 komplexben [73-76].

A DS-ekben az mTORC1 reagál a különböző extracelluláris tétből származó jelekre, úgymint például a növekedési faktorokra, citokinekre vagy a PPR-ek által érzékelt szignálokra, de érzékeli az intracelluláris jeleket is, beleértve a DAMP-okat, tápanyagok szintjét és a sejtek energiatöltését [77, 78]. A receptorok aktiválódását követően a PI3K foszforilálja a PIP2-t PIP3-má, mely a foszfatidil-inozitol-dependens-kináz-1-et (PDK1) a membrán közelébe hozza. A jelpálya negatív szabályozója a foszfataz és tenzin homológ (PTEN), mely a PIP3 defoszforilációját végzi. A PDK1 a Thr 308-as pozícióban foszforilálja az Akt-ot. A teljes aktiválásához szükség van az mTORC2 általi Ser473-as foszforilációra is, ugyanis csak így képes megszüntetni a gumós szklerózis komplex (TSC) mTORC1-t gátló hatását. A TSC a TSC1 (hamartin) és TSC2 (tuberin) fehérjékből áll, az Akt több helyen foszforilálja a TSC2-t, gyengíti a TSC1-vel való kapcsolatát, destabilizálja a komplexet. A TSC gátló hatása alól a RAS homológ agyi fehérje (Rheb) felszabadul, mely az mTORC1 közvetlen aktiválását eredményezi. A PI3K-tól függetlenül a p38, és az ERK képesek foszforilálni és inaktiválni a TSC-t [79]. Az TSC mTOR komplexre kifejtett gátló hatása mindaddig érvényesül, amíg a sejt energiahelyzete és tápanyag ellátottsága nem megfelelő. A sejtek aktuális energiaszintjéről az információt az AMPK közvetíti a TSC felé [80].

Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája, az S6K és a 4E-BP1. Az mTORC1 foszforilálja az S6K1-et, ami további foszforilációs események után éri el teljes aktivitását és foszforilálja a downstream célpontjait: a 40S-et és az S6-ot, ezzel elősegítve a riboszomális biogenezist, mely protein szintézist eredményez és fokozza a sejtproliferációt. Az mTORC1 az S6K-n keresztül az mTORC2 aktivitását is befolyásolja, ugyanis az S6K közvetlenül foszforilálja a Rictort, és így az mTORC2 funkciót gátolja [81]. Továbbá az mTORC1 foszforilálja a 4E-BP1-et, az leválik a transzláció iniciációs faktorról és a gátlás alól felszabadult eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E (eIF4E) elindítja a cap-függő transzlációkat. Jól ismert az mTORC1 autofágiát gátló hatása is, amennyiben rendelkezésre állnak a megfelelő feltételek úgymint például tápanyag és energia. Az mTORC2 upstream szabályozói hasonlóan az mTORC1-hez növekedési faktorok. Az mTORC2 közvetlenül foszforilálja az Akt-ot és aktivitása főként a sejt alakjának változásaiban nyilvánul meg, mivel fontos szerepet játszik az aktin citoszkeleton szerkezetének módosításában [82, 83] (7. ábra).

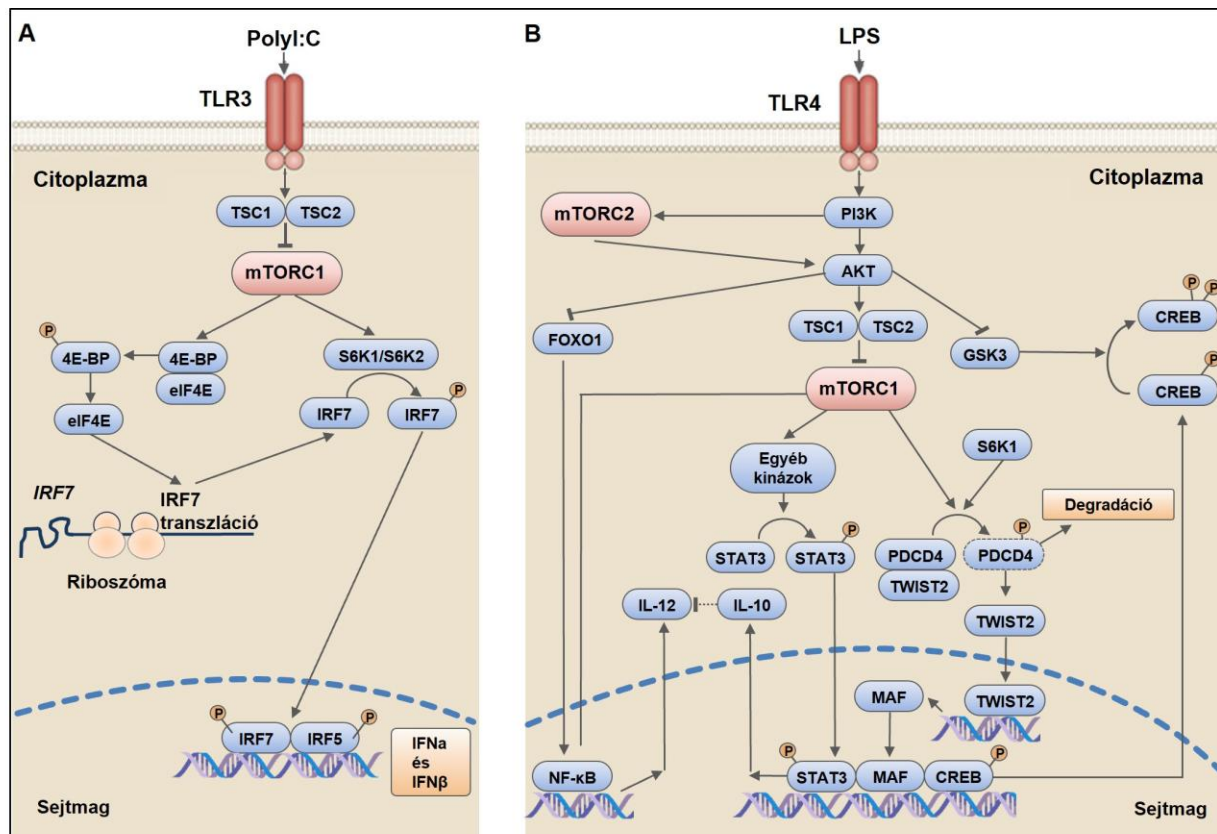


7. ábra. Az mTOR jelátviteli útvonal a veleszületett immunsejtekben. Aktiválás után a PI3K a PIP2-t PIP3-má alakítja és elindítja az útvonal aktiválódását, ennek a folyamatnak a negatív szabályozója a PTEN. A PI3K foszforilálja a PDK1-et, mely aktiválja az Akt-ot. Az mTORC1-et gátló TSC komplex hatásának megszüntetéséhez szükséges az Akt teljes aktiválása, az mTORC2 általi foszforilációval. A PI3K-tól függetlenül a p38 és az ERK képes foszforilálni és inaktiválni a TSC-t. Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája, az S6K1 és a 4E-BP1. 4E-BP1: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje 1, Akt: protein kináz B, COT: tumor progressziós lóbusz 2 (TPL2), ERK: extracelluláris szignál szabályozott kináz, mTORC: rapamycin emlős célpont komplex, PDK: foszfatidil-inozitol-dependens-kináz-1, PI3K: foszfatidil-inozitol-4,5- biszfoszfát-3 kináz, PIP2: foszfatidil-inozitol-biszfoszfát, PIP3: foszfatidil-inozitol-trifoszfát, S6K1: riboszomális S6 kináz 1, PTEN: foszfatáz és tenzin homológ, TSC: gumós szklerózis komplex [84].

II.5.2 Az mTOR jelentősége a DS-ek immunmoduláló funkcióinak szabályozásában

Számos vizsgálatban kimutatták, hogy az mTOR részt vesz a DS-ek immunmoduláló funkcióinak szabályozásában és képes befolyásolni a DS-ek effektor T-sejt aktiváló képességét. Továbbá feltárták az mTOR szerepét az endogén és az exogén antigének bemutatásában is és a TLR-ek által közvetített immunológiai funkciók szabályozásában is. A

TLR-ek aktiválódása a DS-ekben a MyD88 vagy TRIF adapter molekulákon keresztül IRF transzkripciós faktorok indukálásával antivirális citokinek szekrécióját, valamint az NF κ B útvonal aktiválásával pro-inflammatorikus citokinek termelését és kostimulációs molekulák kifejeződését eredményezi. Továbbá a különböző TLR ligandumok, mint például polyI:C és az LPS hatékonyan indukálják a DS-ekben az mTORC1 célmolekulájának az S6K-nak a foszforilációját is, melyet a rapamycin gátol [84] (8. ábra).



8. ábra. Az mTORC1 szerepe a DS-ek citokin termelésében. A. A DS-ekben az I-es típusú IFN-ok expresszióját az mTORC1 szabályozza a célfehérjéinek az S6K-nek és 4E-BP-nek a foszforilálásával. A 4E-BP inaktiválása felszabadítja eIF-4E-t, amely elősegíti az IRF7 mRNS transzlációját. Ezenkívül a foszforilált S6K-ok foszforilálják az IRF7-t, indukálják nukleáris transzlokációját, és az IRF5-tel együtt serkentik az I-es típusú IFN-ok termelését. B. A TLR stimulációk az mTORC1/C2 komplexeken keresztül szabályozzák az IL-10 és IL-12 termelését. Az mTORC1 csökkenti az NF- κ B aktiválódását és az IL-12 expresszióját, melyet az mTORC2 Akt-függő-FOXO1 inaktiválása is támogat. Az mTOR hálózat pozitívan szabályozza az IL-10 expresszióját a STAT3 foszforilációval történő aktiválásával. 4E-BP: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E-kötő fehérje, Akt: protein kináz B, eIF-4E: eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E, FOXO1: forkhead box 1, IFN: interferon, IRF: interferon regulatórikus faktor, LPS: lipopoliszacharid, mTORC1/2: rapamycin emlős célpont komplex1/2, S6K: riboszomális S6 kináz, STAT: transzkripció jelátalakító és aktiváló, TLR: Toll-szerű receptor [84].

Kimutatták, hogy az S6K foszforilációja elmaradt azokban a sejtekben, amelyekben hiányoztak a TLR-ek MyD88 és TRIF adaptermolekulái, ami arra enged következtetni, hogy a TLR aktivációt követően az mTOR is aktivitást nyer és befolyásolhatja a sejtek citokin termelését. Az mTORC1 az IRF-eken keresztül szabályozza az I-es típusú IFN-ok és gyulladást elősegítő gének transzkripcióját, melynek alapvető lépése az aktivált mTOR felvétele a MyD88-IRAK1/4-TRAF3/6 szignalszómába, ahol az IRF-ek mTOR-függő módon aktiválódnak. Az mTOR gátlása megakadályozza az IRF7 és IRF5 szignalszómába való felvételét. Így az mTOR gátlószerének jelenlétében az Flt3L segítségével differenciáltatott egér DS-ekben és humán mieloid DS (mDS)-ekben a TLR9 által vezérelt IFN- α/β termelés jelentősen csökkent [85].

Elsőként részletesebben a pDS-ekben írták le, hogy a TLR-ek által közvetített I-es típusú IFN-ok indukciójához a PI3K-mTOR-S6K útvonal kulcsfontosságú. Egér és humán pDS-eket TLR9 ligandummal CpG-A-val stimulálták és kimutatták, hogy az aktiváció fokozta az mTORC1 fő downstream célpontjának, az S6K-nak a foszforilációját. A rapamycin az S6K aktiválását gátolta, mely az IRF7 foszforilációjának és nukleáris transzlokációjának defektusát és az IFN- α termelés csökkenését eredményezte. Az egér és a humán pDS-ek az IRF7-et konstitutívan expresszálják, ellentétben más DS-ekkel, így a pDS-ekben ehhez kapcsolatosan konstitutívan aktív az mTORC1 útvonal is. Az IFN- α mellett, a TLR9 ligandummal, azaz CpG-A-val aktivált egér és humán pDS-ek kisebb mennyiségben pro-inflammatorikus citokint, így TNF-et és IL-6-ot is szekretálnak, és ezen citokinek termelődését is szignifikánsan gátolta a rapamycin. Továbbá a rapamycinnel kezelt pDS-ek alacsonyabb mértékben indukálták az IFN- γ , IL-17 és IL-10 termelő T-sejteket, valamint az IL-4 és IL-13 termelő Th2 sejteket. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a rapamycinnel kezelt pDS-ek nem képesek *in vitro* stimulálni az antigén-specifikus CD4⁺ T-sejt aktivációt [86]. További tanulmányok szerint a pDS-ekben a 4E-BP transzlációs inhibitorok mTORC1 függő foszforilációja és inaktiválása is az IFN α és IFN β termelést stimuláló IRF7 hatékony transzlációját indukálja [87].

Későbbi vizsgálatok megerősítették, hogy az mTOR elengedhetetlen a humán moDS-ek és a vérben keringő CD1c⁺ cDS-ek polyI:C indukált endoszomális TLR3 által közvetített I-es és III-as típusú IFN-ok szekréciójához. Ugyanis megállapították, hogy az mTOR rapamycinnel való gátlása csökkenti a IFN-ok termelődését az IRF3 transzkripció faktor foszforilációjának gátlásával. Továbbá az mTOR és a TBK1 együttes gátlása nagyobb

mértékben gátolta az IFN-ok termelődését, mint külön-külön, ami azt jelezi, hogy a PI3K és mTOR egy szignalizációs út mentén helyezkedik el és valószínűleg a TBK1-vel közösen szabályozzák az I-es és III-as típusú IFN-ok szekrécióját. Kimutatták továbbá, hogy a különböző DS altípusokban az mTOR eltérően szabályozza a TLR3 indukált fenotípusos érést. A moDS-ekben a polyI:C stimuláció fokozta a CD40, CD80, CD86, CD83 és HLA-DQ expresszióját, melyet a rapamycin, a CD83 aktivációs marker kivételével, szignifikánsan csökkentett. Ugyanakkor a CD1c⁺ DS-ekben csak az aktiváció indukált CD40 és CD80 expresszió csökkent mTOR gátlás esetében, hasonlóan az moDS-ekhez. A HLA-DQ expresszióját az mTOR gátlása nem befolyásolta, míg a CD83 expresszióját szignifikánsan fokozta ezen DS altípusban. T-sejtekkel történő ko-kultivációs kísérletekben a rapamycin előkezelés csökkentette a polyI:C-vel aktivált moDS-ek IFN- γ termelő CD8⁺ T-sejt stimuláló képességét. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az intracelluláris vagy virális antigének elleni DS-ek által mediált immunválaszokban az mTOR-nak fontos szerepe van számos jelátviteli útvonal elindításában [88].

Számos tanulmány foglalkozott az mTOR útvonal szerepével a gyulladásos citokinek termelésének szabályozásában az extracelluláris patogének elleni immunválasz esetében is. Az mTOR-t az NF- κ B jelátviteli útvonal kulcsfontosságú negatív és a transzkripció jelátalakító és aktiváló 3 (STAT3) jelátviteli útvonal pozitív szabályozójaként azonosították. Az LPS-sel stimulált PBMC-ből izolált monocitákban, valamint csontvelőből izolált DS-ekben az mTOR gátlása fokozta az IL-12 citokin expressziót. Ezzel egyidejűleg a rapamycin megakadályozta a programozott sejthalál 4 (PDCD4) LPS által kiváltott lebomlását és gátolta a gyulladást csökkentő IL-10 termelését. Az IL-12 expressziójának jól ismert szabályozói közül a p38 és ERK kinázok foszforilációját a rapamycin nem befolyásolta, míg a JNK aktivitását fokozta, viszont a JNK fő célpontja, az aktivátor fehérje 1 (AP-1) komplex nem volt aktív a kezelt monocitákban [89-91]. Az irodalomban számos, sokszor ellentmondásos eredmény található arról, hogy az mTOR pozitív vagy negatív szabályozó szerepet játszik-e a DS-ek különböző altípusainak TLR által mediált fenotípusos érésében és citokin termelésében. Megállapították, hogy az mTOR eltérő szerepet tölt be az LPS-sel stimulált mDS-ek és moDS-ek aktiválásában és differenciálódásában egyaránt. Míg a rapamycin erősen fokozta az IL-12p40 és IL-6 termelődését CD1c⁺ cDS-ekben (mDS), ugyanezen citokinek termelődését gátolta az aktivált moDS-ekben. Ugyanakkor a rapamycin növelte a biológiailag aktív IL-12p70 termelődését mind mDS-ekben, mind moDS-ekben LPS-sel és IFN- γ -val

végzett együttes stimulációt követően. A TNF- α termelést viszont nem befolyásolta az mTOR blokádnak az mDS-ekben, de szignifikánsan csökkentette az moDS-ekben. Az IL-10 gyulladáscsökkentő citokin termelődését a rapamycin mind az mDS-ekben, mind az moDS-ekben csökkentette, a STAT3 foszforilációjának gátlásán keresztül. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a rapamycin a TLR4 liganddal stimulált mDS-ekben és moDS-ekben eltérően szabályozza a citokin termelést, és jelzi, hogy az NF- κ B és a STAT3 indukciója az mTOR útvonal szabályozása alatt áll a DS-ekben [77].

Az LPS-sel stimulált, különböző DS altípusokban az mTOR szintén eltérően szabályozza a sejtfelszíni molekulák expresszióját is. Míg a rapamycin gátolja az moDS-ek fenotípusos érését, addig az mDS-ekét stimulálja. A mDS-ekben a CD86 és CD25 kostimulátor molekulák expressziója fokozódik az mTOR gátlás hatására, a CD80 expressziója azonban nem változik. Ezzel szemben a rapamycinnel előkezelt és LPS-sel stimulált moDS-ekben a CD86, valamint a CD80 expressziója is csökken [77, 92]. Mivel az mTOR szabályozza a DS-ek pro-inflammatórikus citokin termelését és a kostimuláló molekulák expresszióját, az mTOR gátlás az LPS-vel stimulált DS-ek T-sejt aktiváló képességére is hatással van. Allogén T-sejt aktivációs modellt alkalmazva megfigyelték, hogy a rapamycin növelte az mDS-ek T-sejt stimuláló kapacitását, viszont ezzel ellentétben az mTOR gátlása megakadályozta az aktivált moDS-ek allogén T-sejt-stimulációját. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az mTOR negatívan szabályozza a humán mDS-ek T-sejt-proliferációt indukáló képességét, míg moDS-ek esetében elengedhetetlen a hatékony T-sejt proliferáció kiváltásához [77].

A második generációs mTOR inhibitorok, mint például az AZD8055 és AZD2014, az ATP kötőhelyet célozzák meg az mTOR doménben, így képesek gátolni mindkét mTOR komplex aktivitását. Kimutatták, hogy a rapamycin és az AZD2014 inhibitorok gátolják az egér csontvelői DS-ek differenciálódását [93]. Továbbá az AZD8055 tolerogén fenotípust indukál egér csontvelői DS-ekben, amelyet az MHC II és a kostimulációs molekulák csökkent expressziója, valamint a CD4⁺ T-sejtek proliferációját indukáló kapacitás csökkenése jelez az AZD8055-tel előkezelt és TLR4 stimulált DS-ekben [94].

A különböző DS altípusok aktivációt követően eltérő metabolikus átprogramozáson esnek át. A TLR-ligandok az egér és humán pDS-ekben megnövekedett OXPHOS-t, míg az egér csontvelői DS-ekben és a humán CD1c⁺ mDS-ekben glikolízist indukálnak [32,95-97]. A glikolízist az aktiváció korai szakaszában a TBK1-IKK ϵ -Akt útvonal szabályozza, a

későbbi szakaszban pedig a stimulációs szignáltól függően az mTOR-HIF-1 α vagy mTORC1-MYC. Az mTORC2 is segíti a metabolikus változást a MYC és az Akt aktiválásával. Így az mTOR komplexek olyan transzkripciós programokat is irányítanak, amelyek glükóz transzporterek és glikolitikus enzimek expresszióját indukálják [32,33,98].

Így elképzelhető, hogy a különböző DS altípusok eltérő metabolikus igénye az mTOR eltérő szabályozó funkcióját eredményezi, így az egyes DS altípusokban az mTOR inhibitorok különbözőképpen befolyásolhatják a DS-ek citokin termelését és fenotípusos érését. A fentebb bemutatott irodalmi adatok jól tükrözik, hogy a TLR aktiváció mTOR függését már átfogóan tanulmányozták a különböző DS altípusokban, ugyanakkor az RLR-függő DS funkciók esetében az mTOR szabályozó szerepe még kevésbé ismert.

II.6 A DS funkciók szabályozása exogén módon

II.6.1 A környezeti mikrobák szerepe az immunstátusz kialakításában: higiénia hipotézis és farm hatás

A környezet, amelyben élünk, számos olyan patogén mikroorganizmusban gazdag, melyek káros hatással lehetnek az emberi szervezetre. Óriási számú mikroba kolonizálja bőrünket és nyálkahártyáinkat, amik különálló fiziko-kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, és speciális kölcsönhatásokat alakítanak ki a szövetekben jelenlévő különböző sejttípusokkal. A stabil mikrobiom létrehozása különösen születés előtt és az élet korai szakaszában kulcsfontosságú a gyermekek megfelelő növekedéséhez és fejlődéséhez, valamint immunrendszerük kifejlődéséhez. A kisgyermekekben hároméves korukra fejlődik ki a felnőttekre jellemző komplex mikrobiom, aminek kialakulását nagymértékben befolyásolja például a környezet, a táplálkozás, illetve a különböző gyógyszerszármazékok, különösen az antibiotikumok [99]. Napjainkban széles körben elfogadott, hogy a környezetben, a bőrön, a bélben vagy a tüdőben található jótékony mikrobákkal való szimbiotikus kapcsolat felelős az egészséges immunhomeosztázisért, ami megfelelő immunszabályozáshoz vezet és az allergiás betegségek alacsony előfordulását eredményezi [100].

Számos tanulmány foglalkozik azzal, hogy a fertőzések bizonyos esetekben kedvező hatást gyakorolhatnak az allergiás vagy autoimmun betegségekre. Először több, mint 30 éve Strachan vetette fel, hogy a fertőzések és a nem higiénikus érintkezések védelmet nyújthatnak az allergiás megbetegedések kialakulásával szemben [101]. Azóta számos publikáció foglalkozott az úgynevezett higiénia hipotézissel az epidemiológia, az immunológia és a

klinikai tudományok területein egyaránt. A fő kutatási irányok a vírusos és bakteriális fertőzések allergiás betegségek kialakulásában betöltött szerepének feltárására irányulnak, illetve a környezeti, mikrobiális eredetű anyagoknak való kitettség jelentőségét vizsgálják a veleszületett és adaptív immunválaszok kapcsán. Az allergiás betegségek növekedésében a beltéri és kültéri levegőszennyezésen túl valószínűleg szerepet játszik az is, hogy a nyugati életmód miatt a jólét növekedésével párhuzamosan csökken a fertőzéseknek való kitettség is. Továbbá a jelentősen megváltozott táplálkozási szokások miatt a bél mikrobiomban kedvezőtlen változások következhetnek be. A higiénia hipotézist alátámasztják olyan korábbi és újabb epidemiológiai megfigyelések is, amelyek arról számoltak be, hogy a hagyományos farmon felnövő gyermekeknél, akiket sokféle környezeti mikrobiális hatás ér, csökken az atópiás rendellenességek előfordulása. Bár ennek a megfigyelt hatásnak a pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, feltehetően a gazdálkodási környezetben a magas környezeti endotoxinnak való folyamatos kitettségnek tulajdonítható, ami befolyásolja a veleszületett immunitás szabályozását és elősegíti a Th1 és szabályozó T-sejtek indukcióját [102,103].

A környezeti körülmények közötti különbségek feltárására számos tanulmány készült, köztük például a PARSIFAL és GABRIEL európai keresztmetszeti felmérések, amiben a farmon élő gyerekek és a referenciacsoportok mikrobiális expozíciója és az allergia, atópia kialakulásának kockázata közötti összefüggéseket vizsgálták [104-106]. Ezek a tanulmányok kimutatták, hogy a farmon élő gyerekek a mikrobák szélesebb körének voltak kitéve, mint a referenciacsoportba tartozók és körükben alacsonyabb volt az allergiás megbetegedések aránya [107-109]. A védő farmhatást a korai életkorban a szarvasmarhákkal és a szalmával való érintkezés, valamint a tanyasi tej fogyasztása kapcsán vizsgálták. Míg az asztmára gyakorolt védő farmhatás az állatokkal, mezőgazdasági terményekkel és tanyasi tejjel való érintkezéssel magyarázható volt, addig a szénanátha és az atópiás szenzitizáció esetében a védő hatás nem igazolódott, ami eltérő védő mechanizmusok kialakulását feltételezi. Fontos megjegyezni, hogy a gazdaságban termelt tehéntej fogyasztásának hatása független volt a tehenekkel való érintkezés védő hatásától, ami arra utal, hogy az endotoxin védő hatása különböző beviteli útvonalakon keresztül is érvényesülhet, ugyanis míg a tej a bélrendszeren keresztül fejtheti ki hatását, a tehenekkel való érintkezés az endotoxinok belélegzését követően a légutak nyálkahártyáját érintheti [108,110]. Fontos megállapítás volt továbbá, hogy a mikroorganizmusoknak való környezeti kitettség fordított kapcsolatban áll a

szénanátha, az atópiás asztma és az atópiás hajlam elterjedésével, és a matracporban lévő muraminsav szintje, ami a baktériumok bioindikátora, a sípoló légzés alacsonyabb gyakoriságával jár [104,111].

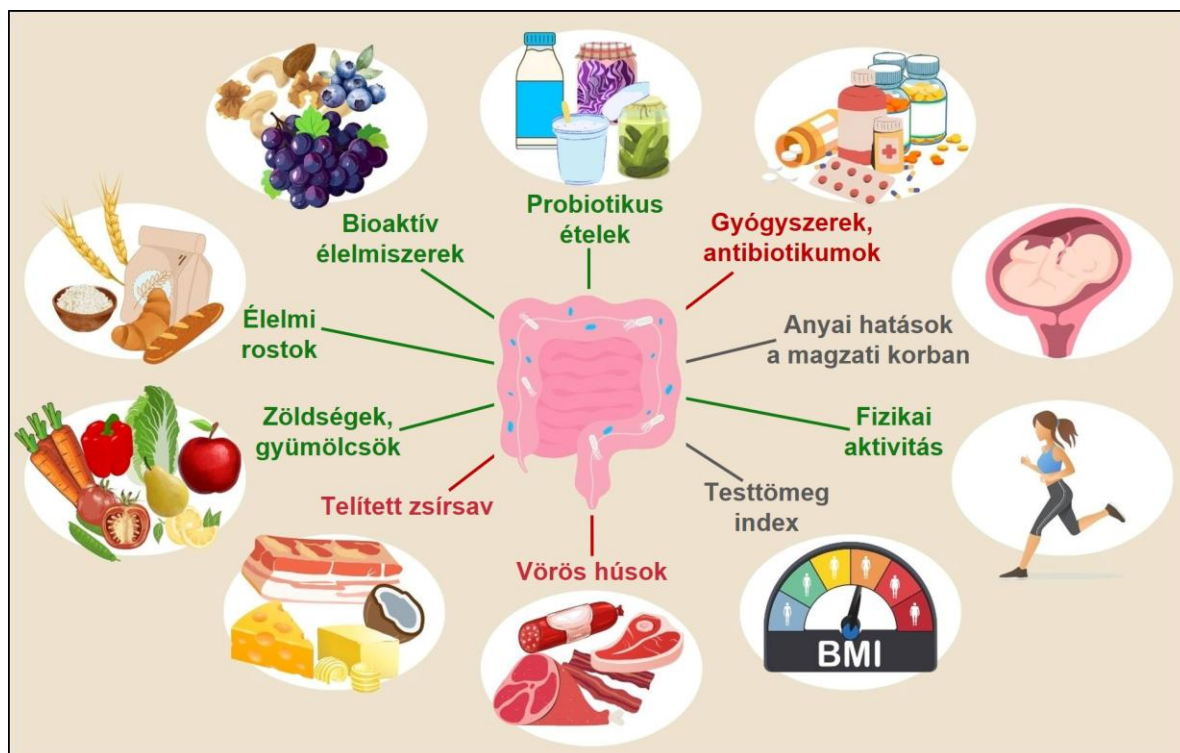
A potenciálisan védelmet biztosító környezeti faktorok közül elsősorban a Gram negatív baktériumokból származó endotoxint emelik ki. A farmon élő gyerekek matracporában nagyobb mennyiségben találtak ugyanis endotoxint és a peptidoglikán egyik komponensét a muraminsavat, továbbá a *Penicillium* és *Aspergillus* spp. gombák extracelluláris poliszacharidjait [107]. Véletlenszerűen kiválasztott városi és vidéki lakásokból származó levegő- és pormintákat összehasonlítva a vidéki lakásokban a beltéri endotoxin szint szignifikánsan magasabb volt a padlón és a matracporban, ugyanakkor a levegő endotoxin koncentrációi között nem figyeltek meg különbséget, megerősítve, hogy a beltéri porminták magas endotoxin szintje a vidéki lakásokban az állattartáshoz kapcsolódik [112-114]. Továbbá a környezeti endotoxinok magasabb koncentrációjának az allergiás szenzitizációra gyakorolt védő hatását nem mezőgazdasági háztartásokban, például kisállattartóknál (kutya, macska) is kimutatták [115]. Korábban a megfigyelések arra utaltak, hogy a penészgombák felelősek a nedvességnek tulajdonítható asztma fokozott kockázataért, viszont megjelentek például olyan tanulmányok is, ahol a *Penicillium chrysogenum* és az *Eurotium cristatum* gombákat az asztma elleni védőfaktorként azonosították [107].

Bizonyítást nyert, hogy a mikrobiális expozíciók befolyásolják a veleszületett immunsejtek PRR-eket kódoló génjeinek expresszióját is, mivel a farmon élő gyerekeknél a *CD14*, *TLR2* és *TLR4* gének fokozott expresszióját találták. Ezen gének expressziója prenatális tényezőkkel is korrelált, mint például az anyák állatokkal való érintkezésével a terhesség alatti időszakban [108,116-118].

Fontos kiemelni, hogy a farm expozíció védő hatásai legerősebbek a prenatális időszakban és a korai gyermekkorban. A legtöbb ezzel kapcsolatos tanulmányban a születés utáni időablak egerek esetében az élet első 3 hetére, míg emberek esetében az első életévre vonatkozik [112,119]. A farmi környezet védőhatása például az allergiás nátha kapcsán iskolás korig érvényesül, és felnőttkorig is tartós hatást fejt ki, különösen folyamatos expozíció esetén [102]. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a hipotézissel, hogy az allergia megelőzésének lehetősége a gyermekkorban rejlik, továbbá felmerülhet a kérdés, hogy szükséges-e további expozíció a gyermekkoron túl a védő hatás fennmaradásához [120].

Egérmodellekkel végzett *in vivo* vizsgálatok megállapították, hogy a belélegzett endotoxin a védő hatását valószínűleg a légúti nyálkahártyán fejt ki. Kimutatták, hogy az alacsony dózisú endotoxin vagy mezőgazdasági por expozíció megvédi az egereket a háziporatka által kiváltott asztma kialakulásától, mivel csökkentette a hámsejtek citokin termelését, ami csökkent DS aktivációt és II-es típusú allergiás gyulladást eredményezett [121]. Továbbá az újszülött egerekben az LPS stimuláció asztma-megelőző hatással bírt, ami csökkent nyálkahártya metapláziával és mucin termeléssel jár asszociált ovalbuminnal történő allergizációt követően. Ezen kísérletben normál thymus stroma limfopoetin (TSLP) és IL-4 szintek mellett megnövekedett IL-12, TNF- α expressziót tapasztaltak [122-123].

Számos tanulmány kimutatta, hogy míg a környezeti mikrobáknak való kitettség segíthet a megfelelő immunstátusz kialakításában, addig a városi környezet és életmód, az étrend jelentős változásai diszbiózishoz vezethetnek a bél-bőr-tüdő-mikrobiomban, és megzavarhatják az immuntoleranciát. Számos tanulmány kimutatta, hogy a gyomor-bél traktus (GIT) mikrobiom diverzitásának kedvezőtlen megváltozása befolyásolja a nyálkahártya immunológiai toleranciáját. A GIT-ben található legtöbb antigén a táplálékból és a bél mikrobiotáiból származik. A regulátor T-sejtek elengedhetetlenek a táplálékból származó antigénekre adott immunválasz elkerüléséhez és ezáltal a tolerancia fenntartásához. Ezenkívül az alacsony IgA szint is kedvezőtlenül befolyásolja a tolerogén folyamatokat és hozzájárulhat az allergia kialakulásához. A bélben uralkodó tolerogén környezet kialakításában fontos szerepe van a bélmikrobiom anyagcseretermékeinek is, így például a rövid szénláncú zsírsavaknak (SCFA), melyek fokozzák a bél immunsejtjeinek tolerogén tulajdonságait. Az emberi bélmikrobiom változását számos környezeti tényező befolyásolhatja [124] **(9. ábra)**.



9. ábra. A bél mikrobiota összetételét befolyásoló tényezők. Számos külső tényező befolyásolhatja a bél mikrobiota összetételét és funkcióit, például az étrend, a fizikai aktivitás, a testtömeg-index, az anyai hatások a magzat fejlődése során, a szülés és táplálás módja, a gyógyszerek, különösen az antibiotikumok. Az élelmi rostok végtermékei, a SCFA csökkenhetik a gyulladás kialakulását a bélben, ezzel szemben fertőzés során a baktériumokból felszabaduló endotoxinok gyulladást elősegítő citokinek túlzott termelődését válthatják ki. A gyulladásos állapotok és a bélmikrobiota diszbiózisának megelőzése érdekében elengedhetetlen olyan étrendi és életmódbeli döntések meghozatala, amelyek a bél mikrobiom diverzitásának és funkcióinak jobbá tételével járnak. SCFA: rövid szénláncú zsírsavak [125.]

Az anyai környezeti hatások már a magzati fejlődés során is meghatározóak a gyermek immunrendszerének a fejlődésében. Az anyai fertőzések, a gyógyszer és a szennyezőanyag expozíciók, az étrend, az anya bélmikrobiotájának állapotában bekövetkező változások mind befolyásoló tényezők lehetnek. Például az anyák terhesség alatti antibiotikum használata elősegítheti a kommenzális és a patogén baktériumok közötti egyensúly felborulását, és összefüggésbe hozható a születendő gyermek asztma kockázatával [126].

Összességében elmondható, hogy a nyugati életmód diszbiózishoz vezethet, ami megzavarhatja az immuntoleranciát és gyulladásos betegségek, például asztma és egyéb allergiás állapotok kialakulását válthatja ki. A szülés után a stabil mikrobiom kialakulása a bőrben, a bélben és a tüdőben kulcsfontosságú az egészséges immunhomeosztázis

fenntartásához és a megfelelő immunszabályozás biztosításához az allergiás betegségek előfordulásának csökkentése érdekében [118,127-130].

Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy a környezeti endotoxin expozíció hatásai nem mindig hatnak kedvezően az allergiás megbetegedések tüneteire [131,132]. Kimutatták ugyanis, hogy nagy dózisú endotoxin akut belélegzése súlyosbíthatja a szenzitizált egyénekben a már kialakult asztmát, továbbá a gyermekek első évében köhögést és zihálást okozhat [133-135]. Az endotoxin allergia és asztma elleni védő hatásainak kifejtéséhez kiemelkedően fontos az időzítés, ugyanis felmérések arra utalnak, hogy a védőhatás elsősorban a prenatális és kora gyermekkori expozíció esetén érvényesülhet [136,137]. Az állatkísérletek is azt igazolják, hogy az endotoxinnal történő beavatkozások akkor lehetnek a leghatékonyabbak és legbiztonságosabbak, ha azokat az allergén szenzitizáció és az atópiás gyulladás kialakulása előtt kezdik meg [15,122,123,138]. Az időzítés, az endotoxin dózisa és egyéb környezeti faktorok mellett a gazdaszervezet-mikrobiom kölcsönhatása is meghatározó az expozíciókra adott immunválaszok kialakításában [119].

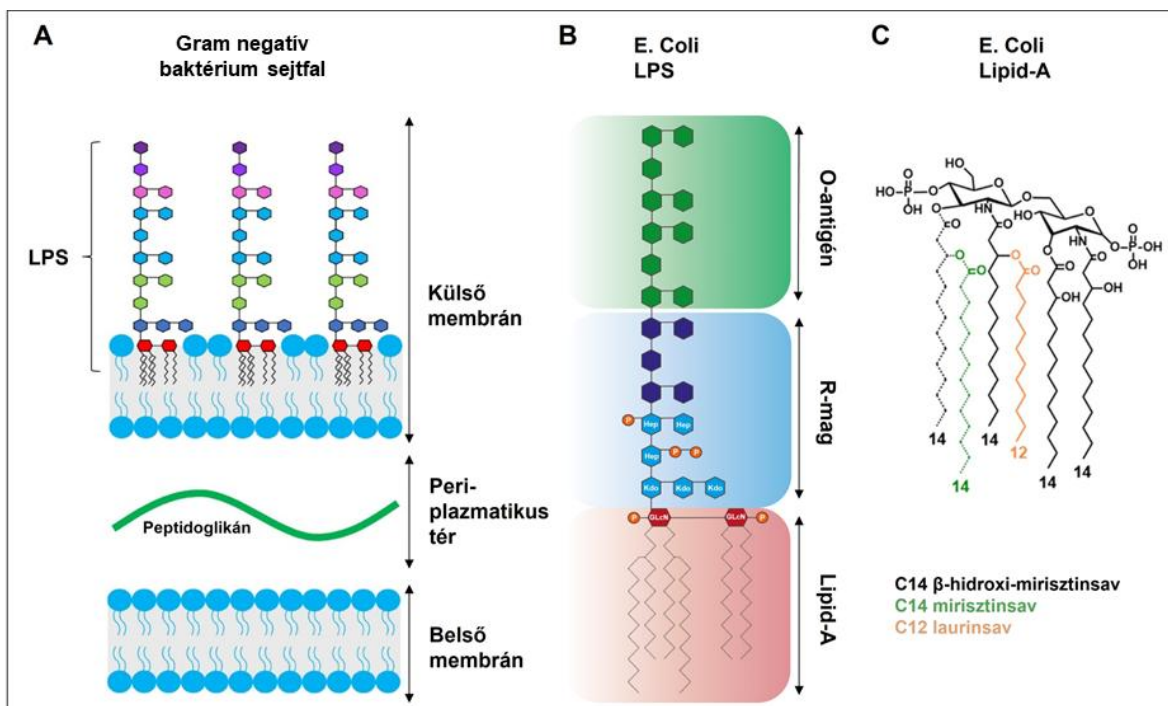
Ezek a megfigyelések együttesen felvetik annak a lehetőségét, hogy a csecsemők belső városi környezetének renaturálása valószínűsíthető megoldásnak tűnik az allergiás betegségek kialakulásának megelőzésére. A farmhatás utánzása a városi környezet endotoxin szintjének helyreállításán keresztül azonban csak tolerálható dózis és az endotoxinok nem toxikus, biztonságos formájának alkalmazásával lehetséges. Az LPS intravénás beadása ugyanis súlyos toxicitást vált ki emlősökben, maximális tolerálható dózisa embereken csak 1-4 ng/testtömeg-kg. Ugyanakkor az LPS toxicitása orális módon történő adagolás esetén meglehetősen alacsony. Például patkánykísérletben kimutatták, hogy nagy dózisú (2 mg/kg) LPS orális adagolása nem volt toxikus az állatokra. Így az LPS orális adagolása tűnik a legmegfelelőbb bejuttatási módnak különböző betegségek, köztük allergiás és életmóddal kapcsolatos betegségek ellen [139].

II.6.2 Az LPS szerkezete

A Gram negatív, endotoxint termelő baktériumok, mint például a *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella pertussis*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli* (*E.coli*) sejtfala három meghatározott struktúrából áll. A külső membrán, egy olyan lipid kettős réteg, aminek belső oldalán foszfolipidek, külső felszínén pedig glikolipidek, főként lipopoliszacharidok találhatók. Ezen felül számos lipoproteint is

tartalmaz, amik az úgynevezett külső membrán proteinek (OMP). Ezen OMP-k feladata, hogy mono és diszacharidok, aminosavak, vas-kelátok, és vitaminok, úgymint például a B12 vitamin transzportját segítsék elő. A külső membránban találhatóak az LPS molekulák, amik igen szorosan kapcsolódnak egymáshoz, különösen kationok, mint például magnézium ionok jelenlétében, melyek neutralizálják a foszfát csoportjaik negativitását. Az LPS esszenciális alkotóeleme a Gram negatív baktériumoknak, a külső felület nagy részét, közel 75 %-át teszi ki. A külső membrán után egy periplazmatikus tér található a sejtfalban, ami egy gélszerű anyag, 1-2 rétegű peptidoglikánnal. A harmadik komponens a belső membrán (IM), mely foszfatidil etanolamint, foszfatidil glicerolt, foszfatidil szerint és kardiopint is tartalmaz. A toxikus LPS-t a Gram negatív baktériumok nem választják ki, az endotoxin csak a baktérium elpusztulása után jut a környezetbe. Az LPS a lipid-A komponensén keresztül képes aktiválni a természetes immunrendszer sejtjeit, mint például a DS-eket, makrofágokat, továbbá az endotél és simaizom sejteket, sőt még a trombocitákat is képes stimulálni [140,141].

A külső membránban található endotoxin a baktériumok egyik fő immunstimuláló része, ami mindenütt jelen van a környezetben és közvetlenül befolyásolhatja az immunválaszok kimenetelét, így nagy jelentősége van számos betegség patofiziológiájában is [142]. A múlt század elején világossá vált, hogy az endotoxin lipidekből és szénhidrátokból áll, ezért került használatba a „lipopoliszacharid” kifejezés. Az első fő kísérletek a molekula szerkezetének tisztázására az 1950-es években kezdődtek, majd későbbi kutatások eredményeként megállapították, hogy a molekulának a lipid része az, amely a toxikus aktivitásért felelős [143]. Napjainkban különböző eljárásokkal számos Gram negatív organizmus LPS szerkezetét jellemezték már, ami általánosságban három különálló régiót tartalmaz: az *O*-poliszacharid régiót az LPS molekula legkülső részén, az *R*-mag poliszacharidokat és a molekula endotoxikusan aktív részét a lipid-A-t [144-146] **(10.ábra).**



10.ábra. A Gram negatív baktérium sejtfal és az LPS szerkezete. **A.** A Gram negatív baktériumok sejtfala kettős, külső és belső membránból áll, melyek lipopoliszacharidokat, lipoproteineket, és fehérjéket tartalmaznak. A külső és belső membrán közötti periplazmatikus térben vékony peptidoglikán réteg van, a külső réteg tartalmazza a liposzacharidokat. **B.** Az LPS három lényeges molekularészből áll: a lipid-A, az R-mag régió, és az O-oldalláncok. **C.** Az E-coli lipid-A szerkezet egy bisz-foszforilált β -1-6 glükózamin diszacharidnak felel meg, mely hexaacilezett rövidebb acilláncokat (β -hidroxi-mirisztinsav, mirisztinsav-C14, laurinsav-C12) hordoz. GLcN: Glükózamin, Kdo: 2-keto-3-dezoxi-oktanoilsav, Hep: L-glicero-D-manno-heptózt, [146].

Az *O*-poliszacharid régió az LPS-molekula legkülső része, és a fő antigén, amelyet a gazdaszervezet antitest válaszai megcéloznak. Az *O*-poliszacharid régió rendkívül változatos, ismétlődő egységei jellemzően 1-8 cukrot tartalmazó oligoszacharidokból állnak, lineáris vagy elágazó szerkezetűek, és olyan szubsztituenseket tartalmaznak, mint a foszfátcsoportok, *O*-acetilcsoportok, glicerín, ribitol stb. Ugyanakkor, számos nagyon virulens kórokozó, például a *B. pertussis*, a *H. influenzae*, az *N. meningitidis* nem mutat *O*-lánc szerkezetet, ezért a bakteriális specificitásért a magstruktúrák felelősek. Az *O*-antigén jelenléte vagy hiánya az LPS szerkezetében meghatározza, hogy az LPS nagy molekulatömegű sima felületű LPS (hosszú poliszacharid láncú) vagy kis molekulatömegű durva LPS (rövid poliszacharid láncú). A durva és félig érdes LPS baktérium törzsei jellemzően rövidebb magrégiókat tartalmaznak, mint amik a sima LPS-ben láthatók [147].

Az R-mag régió belső és külső részre osztható. A külső mag messzebbre nyúlik a baktériumok felszínétől, és nagyobb valószínűséggel tartalmaz gyakori cukormolekulákat,

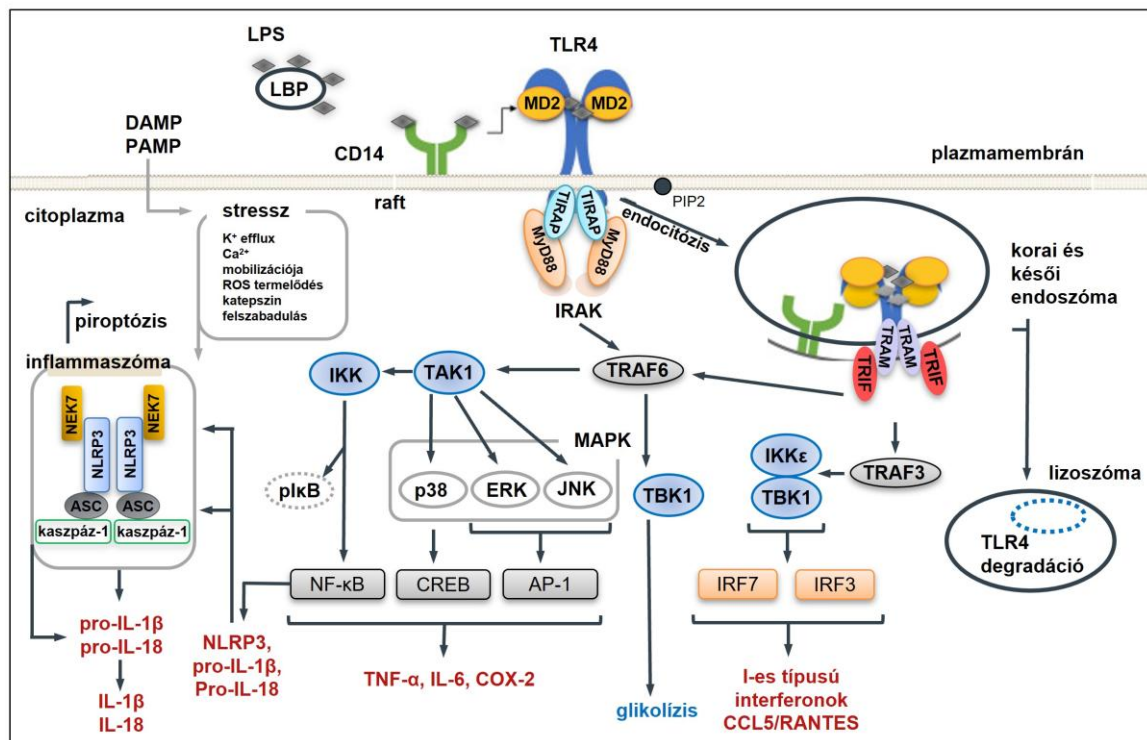
mint például glükózt vagy galaktózt és általában változékonyabb, mint a belső mag. A belső mag nagy arányban tartalmaz szokatlan cukrokat, például 2-kedo-3-dezoxi-oktanoilsavat (Kdo) és L-glicero-D-manno-heptózt (Hep). A Kdo szinte minden eddig vizsgált LPS-ben megtalálható, és minden esetben kötődik a lipid-A szénhidrát gerincéhez. A Kdo-szintézis elengedhetetlen a Gram negatív baktériumok életképességéhez, viszont az LPS erőteljes immunstimuláló képessége nagyrészt az endotoxin lipid-A részének tulajdonítható. Az endotoxin rendkívül ellenálló, immunstimuláló képességének megszüntetéséhez hosszan tartó, magas hőmérséklet (160 °C, 4 óra) szükséges, ami arra utal, hogy az endotoxin immunmodulátorként sokáig megmaradhat a környezetünkben [145].

A lipid-A legjobban konzervált régiója egy foszforilált diglukózamin-gerinc, amely legalább egy Kdo molekulával kapcsolódik. A diglukózamin-gerinc foszforilációs állapota és a foszfát pozíciója befolyásolja az LPS funkcióját. Egyetlen foszfát elvesztése a lipid-A szintetikus formájából csökkenti az LPS által kiváltott gyulladást elősegítő citokinek termelődését, míg a nem foszforilált lipid-A teljesen elveszti immunstimuláló funkcióját [148]. A diszacharid gerinchez legfeljebb négy hidroxizsíracyl-lánc kapcsolódik amid- vagy észterkötéseken keresztül. Ezek az elsődleges acilcsoportok tovább acilezhetők, és legfeljebb hét acillánc lehet jelen egyetlen LPS szerkezetében. A láncok számukban, hosszukban, sorrendjükben és telítettségükben igen változatosak és meglehetősen eltérőek a különböző baktérium fajok között. A mai napig különböző szerkezetű, szintetikus LPS-ek széles skáláját tesztelték biológiai vizsgálatokban, amiből kiderült, hogy az endotoxin toxicitását főként a jelenlévő acilláncok száma és hossza, valamint a diszacharidváz foszforilációs állapota határozza meg [149-151]. Továbbá az LPS-molekulák más amfipatikus molekulákhoz hasonlóan egy adott kritikus koncentráció felett nagyobb szupramolekuláris struktúrákká aggregálódnak, ami befolyásolja az LPS-készítmények endotoxicitását. Széles körben egyetértés van abban, hogy az LPS aggregátumok az LPS legmérgezőbb formái, az LPS monomerei jelentősen kisebb toxicitást mutatnak [145,146].

Megállapították azt is, hogy a lipid-A szerkezete mellett részben a poliszacharid lánc hossza is magyarázhatja az LPS endotoxikus aktivitásának változékonyságát. Kimutatták, például humán makrofágokban, hogy az *E. coli* durva (rövid poliszacharid láncú) LPS-e szignifikánsan nagyobb gyulladást vált ki, mint a sima (hosszú poliszacharid láncú) LPS-e. Az eltérő biológiai hatások közötti különbségek nagy valószínűséggel az eltérő fizikokémiai és farmakokinetikai jellemzőkből adódnak [152].

II.6.3 Az LPS felismerése és hatásai

Az LPS erős immunstimuláló anyag, amely a veleszületett immunitás aktiválását a transzmembrán TLR4 által közvetített jelátvitelen keresztül váltja ki. Az antigénprezentáló sejtek, mint például a DS-ek LPS-sel történő stimulálása azok éréséhez vezet, és citokinek termelését eredményezi (11. ábra).



11. ábra. Az LPS gyulladást elősegítő hatásai a TLR4 útvonal aktiválásával. Az LBP az LPS-aggregátumok felszínéhez kötődik, és segíti, hogy egy LPS-monomer kapcsolódjon a CD14-hez, ezután az LBP disszociál. Az LPS kötődése a TLR4-MD2-höz, két TLR4-MD2 egység dimerizációját indukálja. A TLR4-MD2 aktiválása után a jelátvitelt két fázisra lehet osztani, a korai MyD88 függő és a késői MyD88 független jelátviteli utakra. A korai fázisban a MyD88 a TIRAP-pal, a késői fázisban TRIF a TRAM-mal együtt aktiválja az NF-κB-t, és a késői fázisban a TRIF útvonalon az IRF3, IRF7 transzkripciós faktorokat. Ez korai és késői fázisban pro-inflammatórikus citokinek, és a késői fázisban I-es típusú IFN-ok termelődéséhez vezet. Az aktivált NF-κB-n keresztül a TLR4 hozzájárul a citoszolikus NLRP3 közvetített gyulladás aktiválásához is. CD14: differenciálódás klaszter 14, IFNα/β: interferon α/β, IRF3/IRF7: interferon regulatórikus faktor 3/7, LBP: LPS-kötő fehérje, LPS: lipopoliszacharid, MD2: mieloid differenciálódási fehérje 2, MyD88: mieloid differenciálódási primer válasz fehérje 88, NLRP3: NLR család pirin domént tartalmazó fehérje, TLR4: Toll-szerű receptor 4, TNF-α: tumor nekrozis faktor-α, TRIF: TIR-domént tartalmazó adapter indukáló interferon β [153].

Az LPS-nek aggregált formában kell lennie ahhoz, hogy az LBP-hez és a CD14-hez kötődhessen. A CD14 szállítja az LPS monomert a TLR4-MD2 komplexhez, ahol az LPS lipid-A acilláncai kölcsönhatásba lépnek az MD2 hidrofób zsebével. A TLR4 és az MD2 közötti stabil kölcsönhatást el kell érni az LPS szállítása előtt, mivel kimutatták, hogy a CD14 önmagában nem képes LPS-t átvinni az MD2-re. Az LPS kötődése két TLR4-MD2 egység dimerizációját idézi elő. Például az *E. coli* LPS hexa-acilezett lipid-A-jának hat acillánca közül öt mélyen az MD2 hidrofób zsebében van. A fennmaradó lánc szabaddá válik a felületen, ami lehetővé teszi a szomszédos TLR4 molekulával való kölcsönhatást. A TLR4-MD2 komplex dimerizációja jelzi az LPS fiziológiás felismerését és elindítja a TLR4 által közvetített jelátvitelt. TLR4 molekula mindegyik intracelluláris fragmense tartalmaz egy TIR domént, amely képes négy adapterfehérje TIR doménjeivel kapcsolódni. Az aktiválás korai fázisában a TLR4 az első adapterpárral, a TIRAP-val (más néven Mal) és a MyD88-val kapcsolódik és kötődik az IRAK1/2-höz. Ez a myddoszóma szubmembrán jelátviteli komplex E3 ubiquitin ligázt, azaz TRAF6-ot toboroz és aktiválja a TAK1 kinázt, mely tovább foszforilálja az IKK komplexet, amelyet túlnyomóan az NF- κ B útvonal fő szabályozójának tekintenek. Az aktivált IKK komplex közvetíti az I κ B- α foszforilációját, mely ubiquitinálódik, majd szelektíven és gyorsan lebomlik, és a gátlás alól felszabadult NF- κ B transzkripciós faktor nukleáris transzlokációjához vezet. A TAK1 a MAP kinázokat p38, JNK, ERK is foszforilálja, melyek aktiválják az AP-1 és CREB transzkripciós faktorokat. Összességében a MyD88-függő korai jelátviteli útvonal gyulladást elősegítő mediátorokat kódoló gének expresszióját indukálja, és TNF- α , IL-6, ciklooxygenáz termeléséhez vezet. A MyD88-függő jelátviteli útvonal gyulladásgátló mediátorok, például az IL-10 termelésében is részt vesz. A korai MyD88-függő jelzést a TLR4 internalizálása követi, ezzel egyidejűleg a TIRAP és a MyD88 disszociál a membránról, lehetővé téve a TLR4 számára, hogy az endoszómában megkösse a TRAM-ot és a TRIF-et. A TLR4 TRIF-függő jelátviteli útvonala magában foglalja a TRAF3 ubiquitin ligáz aktiválását, a TBK1 és az IKK ϵ foszforilálását és aktiválását. A TBK1 foszforilálja a TRIF-t, amely szükséges az IRF3 toborzásához, és foszforilációval aktiválja az IRF3-at. Az IRF3 disszociál a TRIF-ről, dimerizálódik, a sejtmagba transzlokálódik. Indukálja az I-es típusú IFN-ok termelését, melyben kisebb mértékben az IRF7 is részt vesz. A TRIF a TRAF6 toborzásával indukálja az NF- κ B késői aktiválódását is [153-158].

Az NLRP3 inflammaszóma formálódását leggyakrabban a TLR4 aktiválásával társítják, melyet a sejtek stressz állapota vált ki, mint például K^+ kiáramlás, mitokondrium diszfunkció vagy lizoszóma károsodás. Az NF- κ B aktivitás MyD88-függő „korai” fázisa az *NLRP3*, *IL-1 β* és *IL-18* gének fokozott transzkripcióját is maga után vonja. Továbbá a TRIF-függő TLR4 jelátvitel az NF- κ B aktivitás „késői” fázisához vezet és tovább növeli az *IL-1 β* génexpressziót, de az *NLRP3*-at már nem. Az NLRP3 gyulladásos folyamatok az *IL-1 β* és *IL-18* éréséhez vezetnek, amik érett formában erős gyulladásos mediátorokként funkcionálnak [159].

Az LPS expozíció erősen befolyásolja a veleszületett antigénprezentáló immunsejtek, főként a DS-ek és makrofágok érését, gyulladásos citokin termelését, kostimuláló hatásait és T-sejt aktiváló képességeit. Az LPS által aktivált DS-ek nagymértékben képesek *IL-12* gyulladásos citokint termelni, ami főként az IFN- γ -t termelő Th1 sejtek indukcióját váltja ki. A termelt IFN- γ visszahatva a veleszületett immunsejtekre, még jobban fokozza az *IL-12* termelést, pozitív visszacsatolási hurkot generálva így a szerzett és a veleszületett immunsejtek között. A TLR4 LPS általi aktiválása mind a DS-ekben, mind a makrofágokban a kostimulátor molekulák (CD40, CD80 és CD86) és az MHC I és MHC II molekulák fokozott expresszióját idézi elő a sejtfelszínen, amik szükségesek az antigének prezentációjához a T-sejtek felé és ezáltal az adaptív immunválaszok beindításához [160,161].

Sepszisben az endotoxin véráramba kerülése számos patológiás reakciót indít el, melyek egymással szoros kölcsönhatásban alakítják ki a különböző szervi és szöveti károsodásokat, a septicus sokk tünetegyüttest, valamint a letális hatást. Az endotoxin szöveti sérülések, műtéti beavatkozások során kerül a vérkeringésbe vagy kóros esetekben a bélből szívódik fel. Természetes körülmények között az epesavak védik a szervezetet a bélben mindig jelen lévő endotoxinok ellen, mert azokat atoxikus részekre hasítják [162]. Sepszisben a szervezet elsőprő pro-inflammatórikus válasszal reagál az infekcióra, amit „citokin viharaként” is szoktunk emlegetni. Ezek között is kiemelkedő jelentősége van a túlzott TNF- α , *IL-6*, *IL-1* termelődésének, melyek szérum szintje jól korrelál a septicus sokk súlyosságával, illetve végső kimenetelével. Az endotoxin súlyos gyulladásos tüneteket (láz, hidegrázás, remegés) okoz, aktiválja a vérárvadási rendszert, fokozza a vérlemezke-aktiváló faktor (PAF) termelődését, indukálja az éren belüli vérárvadást. Az első fázisokban a sepszisre a túlzott szisztémás gyulladásos immunválasz és az apoptózison keresztüli sejthalál

jellemző, a későbbi szakaszban a folyamat súlyosbodását, az esetleges halálos kimenetelt a pro-inflammatórikus folyamatok kimerülése miatti immunszuppresszív állapot jelzi [163,164].

II.6.4 Az LPS toxicitásának befolyásolása

Az endotoxinok és a tisztított származékok immunmoduláló szerként történő alkalmazását korlátozza, hogy súlyos klinikai tüneteket okozhatnak, a korábbi fejezetben leírtak szerint. Ezért számos kísérlet történt fizikai, kémiai vagy bioszintetikus mérnöki megközelítésekkel az LPS endotoxikus aktivitásának csökkentésére, illetve a toxikus és immunstimuláló aktivitás elkülönítésére [165]. Említést érdemel a kálium-metiláttal méregtelenített készítmény az ún. monofoszforil lipid-A (MPLA), melyet az 1980-as években állítottak elő. Immunmoduláló tulajdonságai alapján vakcina-kiegészítőként, antiszeptikus anyagként vagy daganatellenes szerként is használták. Ezenkívül az MPLA az egyik legjobban dokumentált, védő funkciót kiváltó szer a szív ischaemia/reperfúziós sérülés ellen, ugyanis különböző állatfajokban az MPLA kezelés csökkentette az infarktus méretét [166,167]. Egyetlen foszfát elvesztése a szintetikus MPLA-ban azt eredményezi, hogy az endotoxin nem stimulálja megfelelően az NLRP3 expresszióját, ami csökkent gyulladásos citokin termelődéshez vezet. Ugyanakkor az alacsony toxicitás mellett az MPLA megtartja immunmoduláló képességét, így vakcina adjuvánsként engedélyezték. A lipid-A-t tartalmazó liposzóma hatékony, biztonságos, általános adjuváns rendszer szintetikus vakcinákhoz [159,168].

A difoszforil-lipid-A (DPL) a *Salmonella minnesota* R595 törzs LPS-ének méregtelenített változata, ami képes stimulálni az immunrendszert anélkül, hogy közvetlen toxikus hatást váltana ki. A DPL-vel végzett előkezelés neuroprotektív hatást eredményezett az agyi ischaemia *in vivo* patkány modelljében, ugyanis az agyi infarktus és a mieloperoxidáz (MPO) aktivitás jelentős csökkenését és a szuperoxid-diszmutáz (SOD) aktivitás szignifikáns javulását figyelték meg DPL jelenlétében [169].

Az LPS toxicitását bioszintetikus eljárásokkal is befolyásolhatják. Az LPS bioszintézisében résztvevő gének gátlásával vagy módosító enzimek indukálásával úgy csökkenthetik az LPS toxicitását, hogy közben az megtartja adjuváns aktivitását, ami biztonságosabb élő, legyengített vakcinák vagy külső membrán vezikula (OMV) vakcinák előállítását is lehetővé teszi. Például a *Neisseria meningitidis* baktériumban az *lpxL1* gén

deléciója biztonságos OMV vakcinát eredményezett, amint azt egy fázis I-ben lévő klinikai vizsgálat is igazolt. Kimutatták, hogy csökkent toxicitás mellett a baktérium megőrizte potenciálisan immunogén külső membrán komponenseit [170]. Az LPS-t módosító enzimek *E. coli*-ban és más baktériumokban történő befolyásolásával számtalan különböző struktúrájú LPS hozható létre, amik különböző immunstimuláló tulajdonságokkal rendelkeznek és potenciális adjuvánsként is felhasználhatóak [171]. Várhatóan új vakcinaként lesz majd alkalmazható a *Pseudomonas* fertőzések ellen a *Pseudomonas aeruginosa* detoxifikált LPS-e, a D-LPS és az exotoxinja, az A toxoid (T-ETA), valamint az arany nanorészecskékkal alkotott konjugátumai is, amik egerekkel végzett kísérletek alapján jelentős immunogén potenciállal rendelkeznek [172].

A szepszissel összefüggő fertőzések alternatív kezelésére fejlesztettek ki egy „all-in-one” platformot, a zselatin bevonatú nanogéleket, amiket baktericid kolisztinnel, SLAP-S25-tel, azaz LPS-t semlegesítő adjuvánssal és a lipid-A másodlagos acilláncait lebontó acil-oxiacil-hidroláz (AOAH) lipáz enzimmal töltönek fel. A baktericid szerek elpusztítják a Gram negatív kórokozókat, a felszabadult LPS-eket SLAP-S25-tel semlegesítik, így csökken az LPS kötődése és internalizációja. Ezután a semlegesített még szabad LPS-t inaktiválják, méregtelenítik, azáltal, hogy a lipid-A másodlagos acilláncait az AOAH deacilezi [173].

Az endotoxinok méregtelenítésének további hatékony formája az ionizáló ^{60}Co γ -sugárzással történő kezelés, ami leépíti az LPS szerkezetét és a biológiai funkcióinak elvesztéséhez vezet. A növekvő dózisú sugárzás hatására az endotoxin trilamináris, szalagszerű szerkezete gócós szerkezetet mutat és a morfológiai változásokkal párhuzamosan az O-oldallánc ismétlődő egységei és az R-mag liposzacharid molekuláinak egyes darabjai elvesznek. A sugárzás lebontja az egyszerű cukrokat a szerkezeten belül, úgymint a galaktózt, galaktóزامint, glükóزامint, glükózt és heptózt. Ezáltal csökkenti a poliszacharid rész antigenitását. Az R-mag komponense, a Kdo a leginkább ellenálló cukorszarmazék az ionizáló sugárzással szemben. Az endotoxin hidrofób lipid-A része még viszonylag nagy sugárzás mellett is kevésbé degradálódik, mint a cukor komponensei. A lipid-A zsírsavai közül azonban vagy a β -hidroximirisztinsav mirisztinsavvá történő részleges átalakulását vagy szelektív elvesztését figyelték meg a sugárzás hatására. Továbbá a besugárzott lipid-A-ban csökkent a glükózamin és a foszfát mennyisége is [174-178].

Bertók Lórándnak és munkatársainak sikerült olyan 150 kGy erősségű ^{60}Co sugárzással méregtelenített LPS készítményt (RD-LPS, TOLERIN[®]) előállítania, ami

csökkent toxicitást mutatott, miközben megőrizte jótékony immunmoduláló hatását [179,180]. Széleskörű állatkísérletek és embereken végzett vizsgálatok alapján ezen méregtelenített endotoxin készítmények alkalmasak a természetes ellenállóképesség fokozására, különféle sokkos állapotok (sugárbetegség, septicus-sebészeti sokk stb.) kivédésére. Továbbá különböző eredetű immunszuppressziós vagy immunhiányos állapotok javítására, valamint adjuváns hatásuk miatt elölt vírusokból készült oltóanyagok hatásfokának, immunogenitásának javítására [181]. Vannak biztató eredmények a TOLERIN®-nel kapcsolatban a szerzett immunhiányos betegség (AIDS), illetve az azt megelőző állapot, valamint a daganattellenes szerekkel kezelt betegek csontvelő működésének helyreállítása esetében [182]. Továbbá a sugárdetoxifikált endotoxin készítmény, mint immunológiai adjuváns hatásosabb vírus-oltóanyagok (például humán influenza, száj- és körömfájás elleni oltóanyag) előállítását teszi lehetővé. Ezen oltóanyagok sugárdetoxifikált endotoxin tartalmuk miatt a beadás után 24-48 órával, tehát jóval a specifikus ellenanyagok megjelenése előtt jelentősen fokozzák a természetes ellenállóképességet [183,184].

III. Célkitűzések

1. A DS-ek egyedülálló immunmoduláló képességüknek köszönhetően kiváló célpontok az immunválaszok befolyásolására. Munkánk során első célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az endogén szabályozó folyamatok, úgymint az mTOR által történő szabályozás hogyan hat a DS-ek immunológiai funkcióira és immunmoduláló képességeire. Korábban a DS-ek TLR-mediált folyamatainak mTOR függését már széleskörűen tanulmányozták, azonban az mTOR szerepét a humán DS-ek RLR szignalizációjában még nem vizsgálták.

Így elsőként megvizsgáltuk, hogy:

- az RLR aktiváció mTOR függő-e,
- az mTOR gátlása hogyan befolyásolja a moDS-ek és a pDS-ek RLR aktiváció indukált fenotípusos és funkcionális érését,
- az mTOR gátlása hogyan hat az RLR-aktivált moDS-ek és pDS-ek naiv T-sejt aktiváló képességére?

2. Mivel a DS funkciókat a környezetből származó, exogén faktorok is befolyásolják, munkánk másik célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a TLR által közvetített exogén stimulációs jelek módosítása milyen hatással van a humán DS-ek immunmodulációjára. Ismert, hogy a gyermekkori környezeti endotoxin-expozíció védelmet nyújthat az allergia kialakulása ellen, így a beltéri környezet nem toxikus LPS-sel történő renaturálásával megelőzhető lehetne az allergiás tünetek kialakulása. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- hogyan változik a sugárzással méregtelenített LPS (RD-LPS) toxicitása a natív LPS-hez (N-LPS) képest,
- hogyan befolyásolja a TLR által közvetített RD-LPS expozíció a DS-ek funkcióit,
- hogyan hat az RD-LPS aktiváció a moDS-ek T-sejt polarizáló képességére?
- képes-e megelőzni az RD-LPS-sel történő előzetes expozíció a parlagfű okozta Th2 mediált légúti gyulladás kialakulását *in vivo* egérmodellben?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1 A primer humán sejtek izolálása és differenciáltatása

Az egészséges véradóktól származó heparinizált vérminták gyűjtési protokollja megfelelt a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek, és az Országos Vérellátó Szolgálat, valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Regionális és Intézményetikai Bizottsága is jóváhagyta (OVSzK 3572-2/2015/5200, Magyarország). A buffy coat mintákból a perifériális vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) gradiens centrifugálással választottuk el. A CD14⁺ monocitákat PBMC-ből pozitív szelekcióval nyertük ki, mágneses sejt elválasztási módszerrel anti-CD14-hez konjugált mikrogöngyöket használva (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország). A frissen izolált sejteket 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre osztottuk ki 1×10^6 sejt/ml sűrűségben Roswell Park Memorial Institute médium RPMI 1640 tápfolyadékban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok), amelyet kiegészítettünk 10% hővel inaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, Egyesült Államok), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomocinnel (mind a Sigma-Aldrich cégtől), 80 ng/ml GM-CSF-vel (Gentaur Molecular Products, London, Egyesült Királyság) és 50 ng/ml IL-4-gyel (Peprotech EC, Brüsszel, Belgium). A második napon a tápfolyadék felét friss médiumra cseréltük, ami szintén tartalmazta a differenciációhoz szükséges citokineket. A sejteket az 5. napig 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ szint mellett tartottuk és a differenciáció 5. napján használtuk fel a kísérletekhez, amikor is a sejtek több mint 90%-a éretlen DS fenotípust mutatott (DC-SIGN/CD209⁺, CD14⁻).

A humán pDS-eket szintén PBMC-ből izoláltuk pozitív szelekcióval a humán CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) segítségével, majd a sejteket 96 lyukú sejtenyésztő lemezekre osztottuk ki 1×10^5 sejt/200 µl sűrűségben RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich), amit kiegészítettünk 10% hővel inaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomocinnel (mind a Sigma-Aldrich cégtől) és 50 ng/ml rekombináns humán IL-3 citokinnel (Peprotech EC.). A sejteket 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ szaturáció mellett tartottuk.

Az autológ és allogén naív CD8⁺ T-sejteket a humán naív CD8⁺ T-sejt izoláló kittel (Miltenyi Biotec) nyertük ki a PBMC-ből, és a DS-T-sejt ko-kultúra kísérletekhez használtuk. A ko-kultúra összeállításának részletei alább olvashatóak.

IV.2 GEN2.2 humán pDS sejt vonal

A humán pDS sejt vonalat, azaz a GEN2.2 –t, amelyet kísérleteink során használtunk, Dr. Joel Plumas és Dr. Laurence Chaperot (Research and Development Laboratory, French Blood Bank Rhône-Alpes, Grenoble, Franciaország, CNCMI szám: 2938) biztosították [185]. A GEN2.2 sejteket mitomycin C (Sigma-Aldrich) kezelt egér MS5 feeder sejtek rétegén növesztettük (Kat. Sz.: ACC 441, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Németország) RPMI 1640 médiumot (Sigma-Aldrich) használva, amit kiegészítettünk 10 % hő-inaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomocinnel (mind a Sigma-Aldrich cégtől) és 5 % nem esszenciális aminosavakkal (Life Technologies Corporation). A kísérletekhez a GEN2.2 sejteket eltávolítottuk a feeder sejtrétegről és 24 lyukú sejtenyésző lemezekre osztottuk szét 5×10⁵ sejt/500 µl sejtűrűségben teljes RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich). A sejtek tenyésztése és a kezeléseket követő inkubációk 37 °C-on, 5 % CO₂ szaturáció mellett történtek.

IV.3 A vezikuláris stomatitis vírus (VSV) szaporítása és a vírus titer meghatározása

A sejtek élő vírussal történő fertőzésére *vezikuláris stomatitis vírust* (VSV; Indiana szerotípus, VR-1238, ATCC, Manassas, VA, Egyesült Államok) használtunk. A VSV-t a Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Tanszék (Debrecen, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. A vírust 36 órán keresztül 37 °C-on szaporítottuk, melyhez az afrikai zöld majom vese epiteliális Vero sejt vonalat (ATCC-CCL-81) használtuk. A Vero sejteket Dulbecco's modified Eagle's minimal essential médiumban (DMEM, Sigma-Aldrich) tenyésztettük, melyet 10% hő-inaktivált FBS-sel, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomocinnel egészítettünk ki. A sejt vonal tenyésztését és az inkubációkat 37 °C-os termosztátban végeztük, 5 % CO₂ szaturáció mellett. A fertőzött, intakt sejteket vagy a sejttörmeléket centrifugálással (1000×g, 10 perc, 4°C) távolítottuk el. Ezután a felülúszókat 0,45 µm-es steril fecskendőszűrővel (Rephile, Bioscience Ltd., Shanghai, Kína) átszűrtük, majd a vírust tartalmazó felülúszókat Amicon Ultra-15 100K szűrőegységbe (Millipore,

Danvers, MA, USA) helyeztük és lecentrifugáltuk (4000×g, 20 perc, 4 °C). A koncentrált vírust aliquot-okban -80 °C-on tároltuk, és később ezeket a szuszpenziókat használtuk a sejtek megfertőzéséhez. A szuszpenzió vírus titerének meghatározására plakk assay-t végeztünk. A Vero sejteket 12 lyukú szövettenyésztő lemezekre osztottuk szét és a sejtek konfluens rétegét a VSV 10-szeres léptékű sorozat hígításaival oltottuk be, majd a sejteket 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, ezután pedig 0,3 %-os agaróz (Sigma-Aldrich) tartalmú DMEM-et pipettáztunk a sejtrétegre. A DMEM 2 % hő inaktivált FBS-t, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. Ezután a sejteket 2 napig 37 °C-on inkubáltuk, majd 4 %-os formaldehiddel (Sigma-Aldrich) szobahőmérsékleten 1 óráig fixáltuk. A fixálás után az agaróz réteget eltávolítottuk. A plakk képződés láthatóvá tételéhez 0,2 %-os kristályviola (Sigma-Aldrich) oldatot pipettáztunk a tenyésztőlemezek lyukjaiba, majd 5 perc inkubációt követően a lemezeket mostuk és szárítottuk, majd kiszámítottuk a milliliterenkénti plakk képző egységek számát (MOI).

IV.4 Bakteriális endotoxin készítmények előállítása

Az *in vitro*, illetve *in vivo* kísérletekhez használt LPS-t *Escherichia coli* O101RG/W szerotípusú törzsből extraháltuk forró vizes fenol módszerrel [186]. Ez a módszer kiváló tisztaságú LPS-t biztosít, amiben nem található nukleinsav, illetve fehérje szennyeződés [187]. Az LPS izolátumok SDS-PAGE elektroforézissel történő frakcionálását követően az endotoxinokat standard ezüsfestéssel tettük láthatóvá, és Coomassie Blue festést alkalmaztunk a fehérje szennyeződések kizárására, míg etidium-bromid festést a nukleinsav szennyeződések kizárására [188]. A sugárzással méregtelenített LPS-t (RD-LPS; tétele szám: 92040605/K/01; Országos Sugárbiológiai és Sugárhigiéniai Kutatóintézet, Budapest, Magyarország) az LPS natív formájából (N-LPS) állították elő 150 kGy erősségű ⁶⁰Co ionizáló sugárzással. Az N-LPS és az RD-LPS toxicitását BALB/c egereken (4-csoport, csoportonként 8 egér) teszteltük. 48 órás LPS kezeléseket követően az letális dózis (LD) értékek a következők voltak 30 mg/kg dózissal vonatkoztatva: N-LPS=LD25 és RD-LPS=LD0. Az endotoxin aktivitás Limulus amebocyte lizátum (LAL) teszttel lett meghatározva (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), ami RD-LPS/N-LPS=1/1000.

IV.5 Sejtek kezelése

A moDS-ek, primer pDS-ek és GEN2.2 sejtek kezeléséhez a médium felét eltávolítottuk a sejtekről, és rapamycinnel (Merck Millipore, Darmstadt, Németország) vagy AZD8055-tel (Selleckchem, Houston, TX, Egyesült Államok) kiegészített friss teljes tápfolyadékkal helyettesítettük. A rapamycin és az AZD8055 kezelésekhez használt koncentrációja 100 nM volt. Kontrollként DMSO-t tartalmazó tápfolyadékot (végkoncentráció 0,001%) használtunk, mivel az mTOR inhibitorok DMSO-ban voltak oldva. Két órás inkubálás után a sejteket specifikus RIG-I agonistával, 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml; InvivoGen, San Diego, CA, Egyesült Államok) vagy RIG-I/MDA5 agonistával, nagy molekulatömegű polyI:C-vel (1 µg/ml; InvivoGen) stimuláltuk LyoVec™ (InvivoGen) transzfekciós reagens segítségével a gyártó által megadott módon.

A GEN2.2 sejtekben és az primer pDS-ekben a RIG-I és MDA5 expressziójának indukálására a sejteket előzőleg kis dózisu TLR9 agonistával, CpG-A-val (0,25 µM; Hycult Biotech, Uden, Hollandia) kezeltük 16 órán keresztül, majd ezt követte az mTOR inhibitorokkal történő kezelés és a RIG-I/MDA5 receptorokon keresztüli stimuláció. Élő vírusfertőzés esetén a moDS-eket és a CpG-A előkezelt pDS-eket a szintetikus RIG-I/MDA5 agonsták helyett *vezikuláris stomatitis vírus*-sal (VSV; Indiana szerotípus; VR-1238, ATCC) fertőztük 1 MOI mellett 18 órán át.

Az endotoxinok immunmoduláló hatásának vizsgálatához a humán éretlen moDS-eket az ötödik napon 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük 24 órán keresztül. Párhuzamos kísérletekben 5 napos moDS-eket előkezeltünk 1 µM specifikus TLR4 inhibitorral, CLI-095-tel (InvivoGen). Az inhibitorral való 1 órás inkubálás után a sejteket 24 órán át 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel stimuláltuk. A moDS-ek endotoxin toleranciájának indukálására a sejteket 5 ng/ml N-LPS-nek vagy RD-LPS-nek tettük ki a DS differenciálódás 4. napján. 48 óra elteltével a sejtek tápközegét lecseréltük és a sejteket friss médiumban újra aktiváltuk 250 ng/ml N-LPS-vel vagy RD-LPS-vel 24 órán keresztül. Az endotoxinnal kezelt moDS-ek IL-10 termelését mirisztinsav (300 µM; Sigma-Aldrich) jelenlétében is vizsgáltuk.

IV.6 A DS-ek fenotípusos és életképesség vizsgálata áramlási citometriával

A moDS-ek és a GEN2.2 sejtek fenotípusos elemzéséhez a sejteket sejtfelszíni fehérjék ellen termeltetett specifikus monoklonális antitestekkel jelöltük, melyek különböző

fluoreszcens festékekkel voltak konjugálva. A fluoreszcensen jelölt antitestek a következők voltak: anti-CD40-FITC (M5E2 klón), anti-CD80-FITC (2D10 klón), anti-HLA-ABC-FITC (W6/32 klón), anti-CD86-PE (IT2.2 klón), anti-HLA-DQ-PE (HLADQ1 klón), anti-CD83-PeCy5 (HB15e) és az izotípusoknak megfelelő kontroll antitestek (mind a BioLegend cégtől). A sejtek életképességét 7-aminoaktinomicin D (7-AAD; Sigma-Aldrich) festéssel határoztuk meg. A 7-AAD festést 15 perccel az áramlási citometriás elemzés előtt végeztük. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mértük, és az adatokat FlowJo szoftverrel (TreeStar, Ashland) értékeltük ki.

IV.7 Western blot analízis

A western blothoz a sejteket (5×10^5) Laemmli pufferben lizáltuk, majd 100 °C-on 10 percig főztük. A mintákat 7,5 vagy 10%-os SDS-PAGE elektroforézissel elválasztottuk, majd elektrotranszferrel nitrocellulóz membránokra blottoltuk (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Németország). A nem-specifikus kötőhelyeket 5% sovány tejport tartalmazó TBS Tween pufferral (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) blokkoltuk. A membránokat anti-RIG-I (D14G6 klón), anti-MDA5 (D74E4 klón), anti-TBK1 (klón: D1B4), anti-foszfo-Akt (Ser473; D9E klón), anti-Akt (11E7 klón), anti-phospho-p70S6 kináz (Thr389; D5U10 klón), anti-p70S6 kináz (49D7 klón), anti-foszfo-Tank-kötő kináz 1 (pTBK1; D1B4 klón), anti-TBK1 (D52C2 klón), anti-foszfo-p38 (28B10 klón) és anti-p38 (katalógusszám: 9212) (mindegyik a Cell Signaling cégtől, Danvers, MA, Egyesült Államok) antitestekkel reagáltattuk. Kontrollként béta-aktint (β -aktin; C4 klón; Santa Cruz Biotechnology) használtunk. A membránhoz kötődött primer antitesteket egér- vagy nyúlelleses torna-peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Egyesült Királyság) konjugáltattuk 1:5000, illetve 1:10000 hígításban. Ezután a specifikus fehérje sávokat ECL rendszerrel, SuperSignal West Pico vagy Femto kemilumineszcens szubsztrátot használva (Thermo Fisher Scientific) röntgenfilm expozícióval vizualizáltuk. Az immunreaktív sávok denzitometriai elemzését az Image Studio Lite szoftver 5.2-es verziójával (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) végeztük.

IV.8 Kvantitatív valós idejű PCR

Elsőként RNS-t izoláltuk 5×10^5 sejtől Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, Egyesült Államok) felhasználásával, a gyártó utasítását követve. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) készülékkel ellenőriztük. A teljes RNS izolátumot kezeltünk 1 μ g DNáz I-gyel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok), hogy kizárjuk a genomiális DNS amplifikációját, majd az Applied Biosystems High Capacity cDNA RT Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével reverz transzkripciót végeztünk, hogy cDNS-sé írjuk át. A génexpressziós próbákat a Thermo Fisher Scientific-től szereztük be az IL-6, a TNF, a hexokináz 2 (HK2), a laktát-dehidrogenáz A (LDHA) és a hipoxiával indukálható 1-alfa faktor (HIF1A) esetében. Az Integrated DNA Technologies-től (Coralville, IA, Egyesült Államok) pedig a PPIA (ciklofilin A) és az IFNA1 primereket használtuk. A kvantitatív PCR-t az ABI StepOne Real-Time PCR rendszer (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük, és a ciklus küszöbértékeit (cT) a StepOne v2.1 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific) határoztuk meg. Az adott mRNS normalizált expresszióját minden kísérletben a PPIA háztartási génre történő normalizálással kaptuk meg.

IV.9 Enzim-kötött immunoszorbens esszé (ELISA) és laktát esszé

Kezeléseket követően a sejtkultúrák felülúszóit a megadott időpontokban összegyűjtöttük és az IFN- α szinteket a VeriKine™ Human Interferon Alpha ELISA kit segítségével mértük (PBL Interferon Sources, Piscataway, NJ, Egyesült Államok), míg az IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 és TNF- α koncentrációjának meghatározásához a BD-OptEIA humán ELISA kiteket (BD Biosciences) használtuk a gyártó utasításait követve.

A sejtek laktát termelését a Glycolysis Cell-Based Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, Egyesült Államok) alkalmazásával detektáltuk a gyártó által megadott protokoll alapján. A minták abszorbancia értékeit az ELISA és a laktát esszé esetében is Synergy HT mikrolemez-olvasóval (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, Egyesült Államok) detektáltuk. Az ELISA abszorbancia méréseket 450 nm-en, míg a laktát esszé méréseit 490 nm-en végeztük.

IV.10 Az intracelluláris reaktív oxigén származékok (ROS) termelésének mérése humán moDS-ekben

Az endotoxinokkal történő kísérletek kapcsán az 5 napos humán moDS-eket 50 μ M fluoreszcens 2',7'-dihidroklór-fluoreszcein-diacetáttal (H_2DCF -DA; Invitrogen, Waltham, MA, USA) töltöttük fel, majd 25 percig 37 °C-on, sötétben inkubáltuk a mintákat. Inkubálás után a sejteket kétszer mostuk PBS-sel (PAA Laboratories GmbH), hogy eltávolítsuk a felesleges fluoreszcens festéket, majd a sejteket 2 órán át endotoxinokkal kezeltük teljes RPMI tápfolyadékban. A DCF fluoreszcencia intenzitásának változásait FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) segítségével értékeltük az FL1 (530 $\pm$ 15 nm) csatornában, és az adatok elemzését a FlowJo v. 5.7.2 szoftverrel (Treestar, Ashland) végeztük.

IV.11 T-sejtek proliferációjának és aktivitásának vizsgálata áramlási citometriával

A DS-T-sejt ko-kultúrák esetében az előzetesen kezelt moDS-eket és primer humán pDS-eket kétszer mostuk, majd allogén naív $CD8^+$ T-sejtekkel ko-kultiváltuk RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich), amit kiegészítettünk 10% hő-inaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation), 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 μ g/ml streptomocinnel (mind a Sigma-Aldrich cégtől) és 1 μ g/ml anti-humán CD3 monoklonális antitesttel (BD Biosciences). A T sejtek proliferációjának vizsgálatakor a T-sejteket a ko-kultiváció előtt 0,5 μ M fluoreszcens karboxi-fluoreszcein szuccinimidil-észterrel (CFSE, Invitrogen) töltöttük fel és 96 lyukú tenyésztő lemezekre osztottuk szét a kezelt DS-ekkel együtt 2×10^4 DS: 2×10^5 T-sejt arányban 200 μ l teljes RPMI 1640 médiumban. Öt napos ko-kultivációt követően a T-sejtek CFSE fluoreszcencia intenzitását az FL1 (530 $\pm$ 15 nm) csatornában detektáltuk BD FACS Calibur áramlási citométer segítségével (BD Biosciences).

Az intracelluláris citokin festéshez allogén naív $CD8^+$ T-sejteket ko-kultiváltunk 48 lyukú sejtenyésztő lemezekben 1:10 arányban (1×10^5 DS: 1×10^6 T-sejtek) előzetesen megkezelt DS-ekkel 500 μ l teljes RPMI 1640 médiumban. Hat napos ko-kultivációt követően a T-sejteket újrástimuláltuk 0,1 μ g/ml forbol-mirisztát-acetáttal és 1 μ g/ml ionomicinnel (mindkettő a Sigma-Aldrich cégtől), fehérje transzport inhibitor, azaz monenzin jelenlétében (BD Biosciences) 5 órán át. Ezt követően a sejteket anti- $CD8$ -FITC-vel (SK1 klón) és megfelelő izotípusú kontroll antitesttel (mindkettő BioLegend, San Diego,

CA, Egyesült Államok) inkubáltuk, majd fixáltuk és permeabilizáltuk a sejteket BD Cytofix/Cytoperm oldattal (BD Biosciences). A sejteket ezután APC-konjugált anti-IFN- γ (4S.B3 klón) és anti-Granzim B (QA18A28 klón) antitestekkel és megfelelő izotípusú kontroll antitestekkel (mind a BioLegend cégtől) reagáltattuk. A fluoreszcencia intenzitásokat FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) mértük, és az adatokat FlowJo szoftverrel (TreeStar, Ashland, OR) értékeltük.

IV.12 T-sejtek citokin termelésének vizsgálata enzim-kötött immunospot (ELISPOT) módszer segítségével

A humán moDS-eket 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük 24 órán keresztül. Inkubálás után a moDS-eket kétszer mostuk RPMI 1640 mediummal, és autológ vagy allogén humán CD3⁺ pan-T-sejtekkel ko-kultiváltuk 1:10 arányban (moDS/T-sejt) 48 lyukú szövettenyésztő lemezekben 500 μ l teljes RPMI 1640 médiumban. Négy napos ko-kultivációt követően az IFN- γ termelő T-sejtek számát a humán IFN- γ -ra specifikus kereskedelmi forgalomban kapható ELISPOT kit-tel (eBioscience, San Diego, CA, USA) határoztuk meg a gyártó utasításait követve. A T-sejteket kétszer mostuk PBS-sel (PAA Laboratories GmbH) és szérumentes tápközegben (Cellular Technology Ltd., Bonn, Németország) 1×10^5 sejt/ 100 μ L/lyuk sejtsűrűségben polivinilidén-difluoriddal bevont 96-lyukú MultiScreen lemezekre (Millipore, Schwalbach, Németország) helyeztük és 24 órán keresztül inkubáltuk. A lemezeket előzőleg anti-IFN- γ befogó antitesttel inkubáltuk, majd 10%-os hővel inaktivált FBS-sel kiegészített RPMI 1640 médium segítségével blokkoltuk a szabadon maradt felületeket a lemezekben. Inkubációt követően a sejteket eltávolítottuk a lemezekről, és detekciós antitestekkel reagáltattuk a lemezeket 2 órán keresztül. Majd a lemezeket 45 percig inkubáltuk avidin-torma-peroxidáz konjugátum jelenlétében, végül BD ELISPOT AEC (3-amino-9-etilkarbazol) szubsztrátot (BD Biosciences) adtunk hozzá. Szobahőmérsékleten 5-30 percig hagytuk állni a lemezeket a színreakció bekövetkeztéig, majd desztillált vízzel leöblítettük a lemezeket. Szárítást követően a keletkező spotokat (IFN- γ termelő T-sejtek) ImmunoScan analízátorral ImmunoSpot 4.0 szoftverrel (Cellular Technology Ltd.) segítségével számoltuk meg.

IV.13 Ultra-nagynyomású folyadékkromatográfia (UHPLC) elektropray-ionizációs négypólusú repülési idő tömegspektrometriával (ESI-QTOF-MS)

Az LPS-kivonatok β -hidroximirisztinsav-tartalmának elválasztása és tömegspektrometriás detektálása Infinity 1290 UHPLC-vel (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) kapcsolt 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS rendszerrel (Agilent Technologies, Singapore) történt, melyet kollaborációs partnereink Dr. Kocsis Béla (PTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és Immunológiai Klinika, Pécs) és Dr. Sándor Viktor (PTE Orvostudományi Egyetem Bioanalitikai Intézet és Szentágotthai Kutatóközpont, Pécs) végzett. Először a szabad zsírsavakat extraháltuk az N-LPS és az RD-LPS mintákból úgy, hogy 300 μ l vizet és 300 μ l hexánt (VWR, Leuven, Belgium) adtunk a 2 mg-os mintákat tartalmazó 1,5 ml-es Eppendorf-csövekhez. Az elegyet vortexeltük 10 másodpercig, majd 5600 $\times g$ -vel 5 percig centrifugáltuk. A hexános fázist egy külön Eppendorf-csőbe gyűjtöttük, és nitrogén atmoszférában szárítottuk. Az extrakciós eljárást 5 alkalommal megismételtük. Az összegyűjtött üledéket feloldottuk 50 μ l acetonitril/5 mM ammónium-acetát elegyében (B eluens; 98:2 v/v %, pH 7,0, Sigma-Aldrich). Az A eluens 5 mM ammónium-acetát (pH 5,0) volt. A kromatográfiás elválasztást a Phenomenex cég teljesen porózus Kinetex C18 oszlopával (100 mm $\times$ 4,6 mm, 2,6 μ m részecskeméret) végeztük. A mintaoldatok injektált térfogata 3 μ L volt. Az elválasztást 40 °C-on, állandó 0,5 ml/perc áramlási sebesség mellett végeztük. Az eluálást 70%-tól 100%-ig terjedő lineáris B-mozgófázis gradienssel hajtottuk végre 7 perces beállított idő alatt, és az oszlopot 5 percig újra reagáltattuk 70%-os B eluenssel. Az oszlop eluátumok negatív ion tömegspektrumait rögzítettük m/z 150-300 tartományban, 10 000 tranziens/s mérési frekvencián és 4 GHz-es észlelési frekvencián. Az Agilent Jet Stream (AJS) ionforrást a következő feltételekkel üzemeltettük: a porlasztó gáz (N₂) nyomása 30 psi; a szárítógáz (N₂) hőmérséklete és áramlási sebessége 325 °C, illetve 8 l/perc volt; a köpenygáz hőmérséklete és áramlási sebessége 300 °C, illetve 11 l/perc volt. A kapilláris feszültséget 4 kV-ra, a fűvóka feszültségét 1,8 kV-ra, a fragmentor potenciált 100 V-ra, a skimmer potenciált 65 V-ra állítottuk. A standard-et (Sigma-Aldrich) a B eluensben hígítottuk és a munkaoldatok előállítását a törzsoldat B eluenssel történő hígításával végeztük. A munkaoldatok koncentrációja 8,00, 4,00, 2,00, 1,00, 0,5, 0,25 és 0,13 μ g/ml volt.

IV.14 *In vivo* egérkísérletek

Hat hetes nőstény BALB/c egerek (4-10 csoport, csoportonként 8 egér) ketreceit (takarmány és alom) 70 napon át naponta kezeltük 5 µg N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel 5 ml endotoxin mentes vízben oldva (Kat. sz.: TMS011; Sigma-Aldrich) aeroszolos spray formájában. Kontrollként csak endotoxin mentes vizet használtunk. A gyártó által biztosított ultratiszta víz (endotoxin < 0,005 EU/mL) endotoxin mentes állapotának megőrzése érdekében az LPS feloldását mindig frissen, steril körülmények között, autoklávban (121 °C-on és 15 psi nyomás, 60 perc) sterilizált laboratóriumi eszközök felhasználásával végeztük. Az endotoxin optimális kezelési dózisát korábbi irodalmi adatok alapján állapítottuk meg [189]. A 70 napos LPS kezelési periódus alatt az egereket a 60. és 64. napon intraperitoneálisan kétszer szenzitivizáltuk 150 µg endotoxin-mentes parlagfű pollenkivonattal (RWE; Greer Laboratories, Lenoir, NC, USA), amit alumínium-hidroxiddal együtt 100 µl PBS-ben (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Ausztria) oldottunk fel. A 71. napon, amikor az LPS-kezelések befejeződtek, 100 µg intranazálisan adott RWE-vel váltottuk ki az allergiás gyulladást az állatokban. Ezután 72 órával az allergénnel való kezelést követően az egereket termináltuk és a bronchoalveoláris mosófolyadékból (BALF) származó gyulladásosejteket elemeztük. Az elaltatott egerek légcsövét kanült helyezettünk és az egerek tüdejének átmosását 2 x 0,7 ml PBS-sel (PAA Laboratories GmbH) végeztük. A BALF mintákat 400×g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk, hogy a sejtek leülepedjenek. A felülúszó eltávolítása után a sejteket PBS-ben szuszpendáltuk. A sejtek tárgylemezre való cito-centrifugálása után a preparátumokat Wright-Giemsa-val megfestettük és fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk a sejt számokat. A festett tárgylemezeken legalább 400 sejt megszámlálásával határoztuk meg az eozinofilek, neutrofilek, limfociták és makrofágok számát.

Az állatok gondozása és kezelése a Helsinki Nyilatkozat és az Európai Unió előírásait, valamint az IASP Kutatási és Etikai Kérdések Bizottságának irányelveit követte. Az összes állatkísérletet jóváhagyta a Debreceni Egyetem Állatgondozói és Védelmi Bizottsága (#7/2011/DE MAB). Az állatokat a Debreceni Egyetem kórokozómentes állatházában tartottuk, ahol az élelmet és vizet tetszés szerint elérhették az állatok.

IV.15 Statisztikai analízis

Az adatokat az ábrákon átlag ± szórásként (SD) ábrázoltuk. Az eloszlások meghatározásához Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzéshez normál eloszlás esetén egyutas

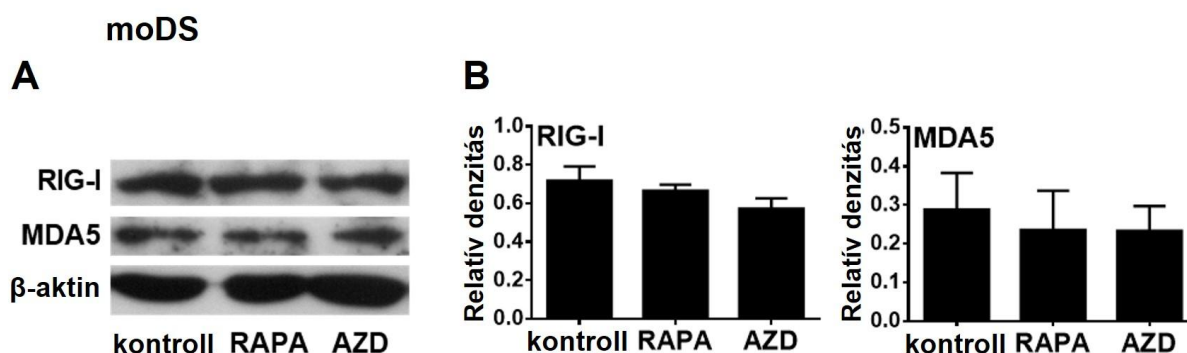
varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, Bonferroni post-hoc teszttel. Nem normál eloszlásnál a statisztikai elemzéshez Kruskal-Wallis tesztet használtunk, Dunn's post-hoc teszttel kiegészítve. A statisztikailag szignifikáns különbségek meghatározására a GraphPad Prism v.6 szoftvert (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) használtuk. A különbségeket $p < 0,05$ értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

V. Eredmények

V.1 Endogén immunmoduláció: mTOR szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek RLR aktiváció indukált immunválaszaiban

V.1.1 mTOR aktivitás vizsgálata az RLR aktivált moDS-ekben

Az mTOR szabályozó szerepét a DS-ek immunválaszaiban elsőként moDS-eken vizsgáltuk specifikus mTOR inhibitorok alkalmazásával. Kísérleteinkhez az mTORC1 specifikus gátlószerét, a rapamycint és az ATP-kompetitív katalitikus inhibitorát, az AZD8055-t használtunk, mely az ATP kötő helyet célozza meg az mTOR doménben, így mindkét mTOR komplex aktivitását képes egyszerre gátolni [72]. Első lépésben megvizsgáltuk az RLR receptor család két tagjának, az RLR jelátviteli útvonalat aktiváló RIG-I és MDA5 receptoroknak az expressziós szintjét mTOR inhibitorokkal történő kezeléseket követően. Ezzel a lépéssel igazolni szeretnénk volna, hogy az mTOR gátlása nem változtatja meg döntően az RLR-ek alap expresszióját, mely befolyásolhatná későbbi kísérleteink kimenetelét. A moDS-eket 2 órán keresztül mTOR gátlókkal, rapamycinnel vagy AZD8055-tel kezeltük, majd western blot analízissel vizsgáltuk a RIG-I és MDA5 fehérjeszinteket. Eredményeink azt mutatták, hogy a moDS-ekben alap szinten is kifejeződnek a RIG-I és MDA5 receptorok és az mTOR gátlása nem változtatja meg ezen receptorok alapexpresszióját a kezeletlen sejtekhez képest (12. A,B ábra).

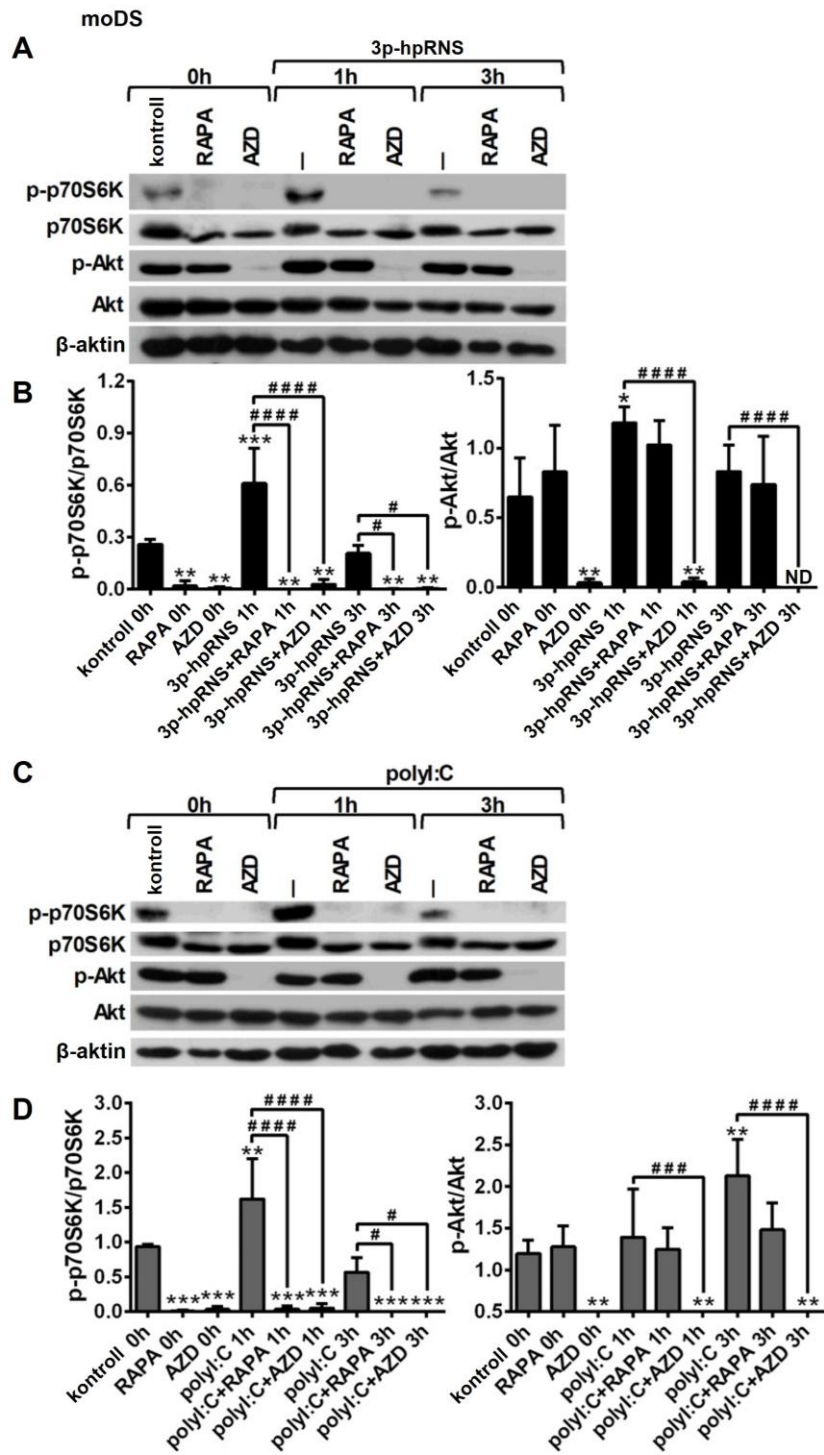


12. ábra. Az mTOR gátlása nem befolyásolja az RLR-ek fehérjeszintjét moDS-ekben. Az éretlen moDS-eket (A,B) 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) kezeltük 2 órán át, majd a RIG-I, MDA5 fehérjeszinteket western blot analízissel vizsgáltuk. (A). A reprezentatív blotok láthatók (B). Az oszlopdiagramok a β -aktinra normalizált relatív denzitás értékeket mutatják, és legalább 3 független kísérlet átlagát $\pm$ SD jelenítik meg.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az RLR-ek által mediált jelátvitel aktiválja-e az mTOR szignalizációt a moDS-ekben. Számos tanulmány kimutatta, hogy a PI3K/mTOR útvonal központi szerepet játszik a különböző immunsejtek, köztük a DS-ek fejlődésének, differenciálódásának irányításában, illetve citokin termelésük és T-sejt-stimuláló hatásuk szabályozásában [69,89].

Először az mTORC1 legfontosabb célmolekulájának, az S6K-nak (p70S6K, Thr389), valamint az mTORC2 downstream célpontjának számító Akt-nak (Ser473) a foszforilációját vizsgáltuk specifikus RIG-I stimuláció hatására. Az 5 napos éretlen moDS-eket 2 órán át előkezeltük mTOR inhibitorokkal, majd a RIG-I specifikus agonistájával, 3p-hpRNS-sel stimuláltuk a sejteket különböző inkubációs idők mellett. Ezt követően a p70S6K (Thr389) és az Akt (Ser473) foszforiláció kinetikáját western blot módszerrel vizsgáltuk **(13. A,B ábra)**. Eredményeink azt mutatták, hogy a RIG-I stimuláció szignifikánsan fokozta a p70S6K (Thr389) foszforilációját, ami 1 óra aktiválást követően érte el a csúcst, ugyanakkor a p70S6K foszforilációját jelentősen gátolta a rapamycin és az AZD8055 előkezelés is. Az Akt (Ser473) foszforilációja is 1 óránál fokozódott szignifikánsan, melyet az AZD8055 gátolt hatékonyan **(13. A,B ábra)**.

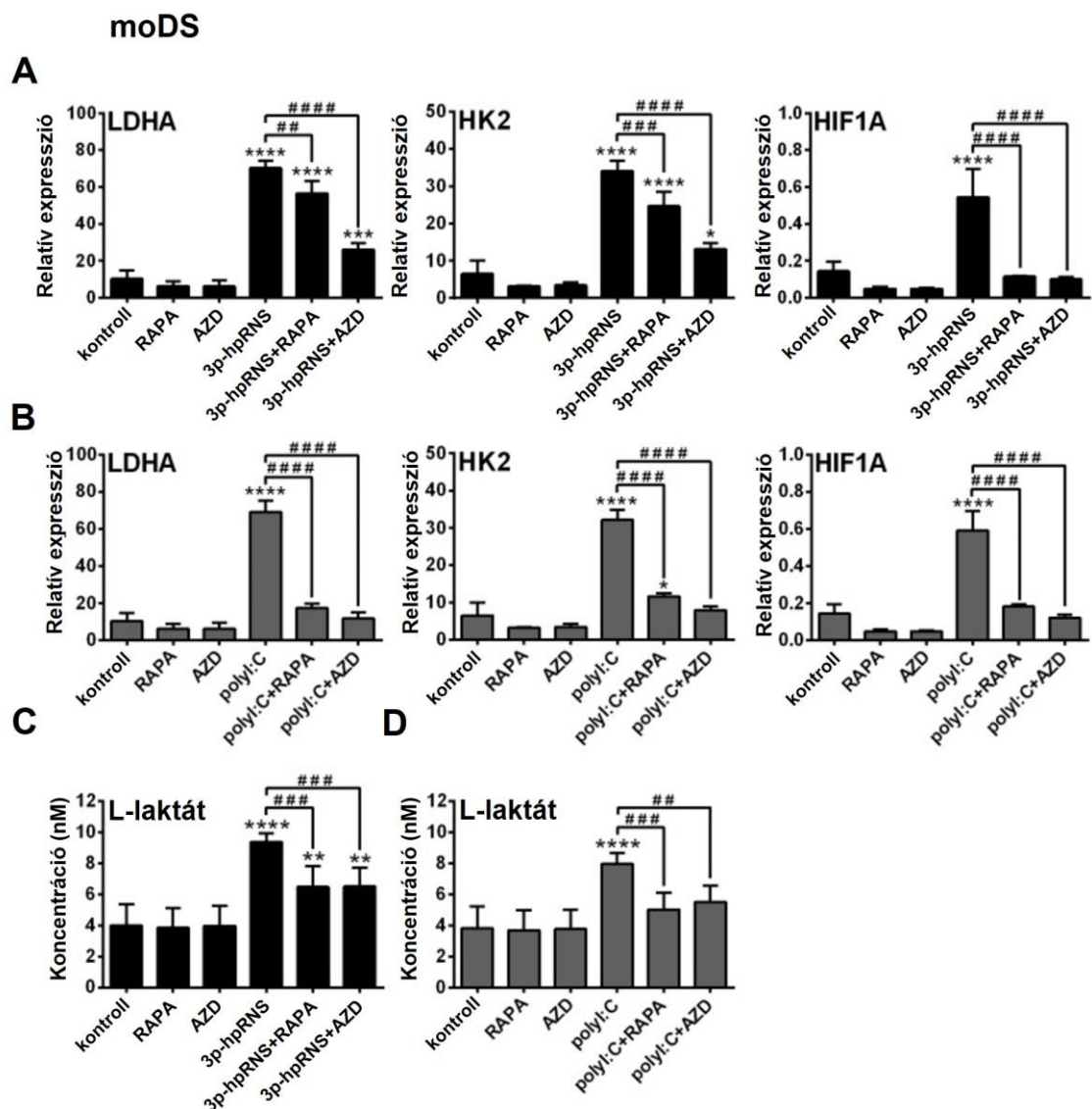
Párhuzamos kísérletekben a moDS-eket polyI:C/LyoVecTM komplex-szel kezeltük **(13. C,D ábra)**. A polyI:C a RIG-I/MDA5 receptorokon kívül az endoszomális TLR3 receptor ligandja is lehet, így kísérleteinkben a polyI:C-t LyoVecTM transzfekciós reagenssel komplexben alkalmaztuk, mely lehetővé teszi, hogy a felismerés főként csak a citoplazmatikus RLR (RIG-I, MDA5) receptorokon keresztül valósuljon meg. Továbbá a polyI:C/LyoVecTM komplexet az MDA5 előnyben részesíti, így főként az MDA5 aktivátoraként tartják számon [60]. A polyI:C/LyoVecTM-vel végzett aktiváció a p70S6K és az Akt foszforilációját is egyaránt szignifikánsan növelte, a p70S6K 1 óra, míg az Akt 3 óra aktiválás után érte el a legmagasabb foszforiláltsági szintjét. Az mTORC1 specifikus inhibitora a rapamycin az mTORC1 célmolekulájának, a p70S6K-nak a foszforilálódását gátolta, míg az Akt-ot nem. Ugyanakkor a kettős mTORC1/2 inhibitor, az AZD8055 hatékonyan gátolta mind a p70S6K-nak, mind az mTORC2 célmolekulájának, az Akt-nak a foszforilációját a polyI:C/LyoVecTM-vel aktivált moDS-ekben **(13. C,D ábra)**. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az RLR-eken keresztül történő aktiváció az mTOR jelátviteli útvonalak aktivitását indukálja moDS-ekben, mutatva az RLR receptorok mTOR függőségét.



13. ábra. A RLR stimuláció fokozza az mTORC1 és mTORC2 aktivitását moDS-ekben. Az éretlen moDS-eket előkezeltük 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-sel (AZD) 2 órán át. Majd 3p-hpRNS-sel (0,5µg/ml) (A,B) vagy polyI:C-vel (1µg/ml) (C,D) stimuláltuk a sejteket különböző inkubációs idők mellett. A p70S6K és az Akt foszforiláció kinetikáját western blot módszerrel határoztuk meg. Az (A,C) panelek a reprezentatív blotokat mutatják be, a (B,D) paneleken legalább 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SD látható. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a 0h kontrollhoz képest, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$, ND: nem detektálható.

V.1.2 Az mTOR gátlás hatása a moDS-ek RLR közvetített metabolikus változásaira

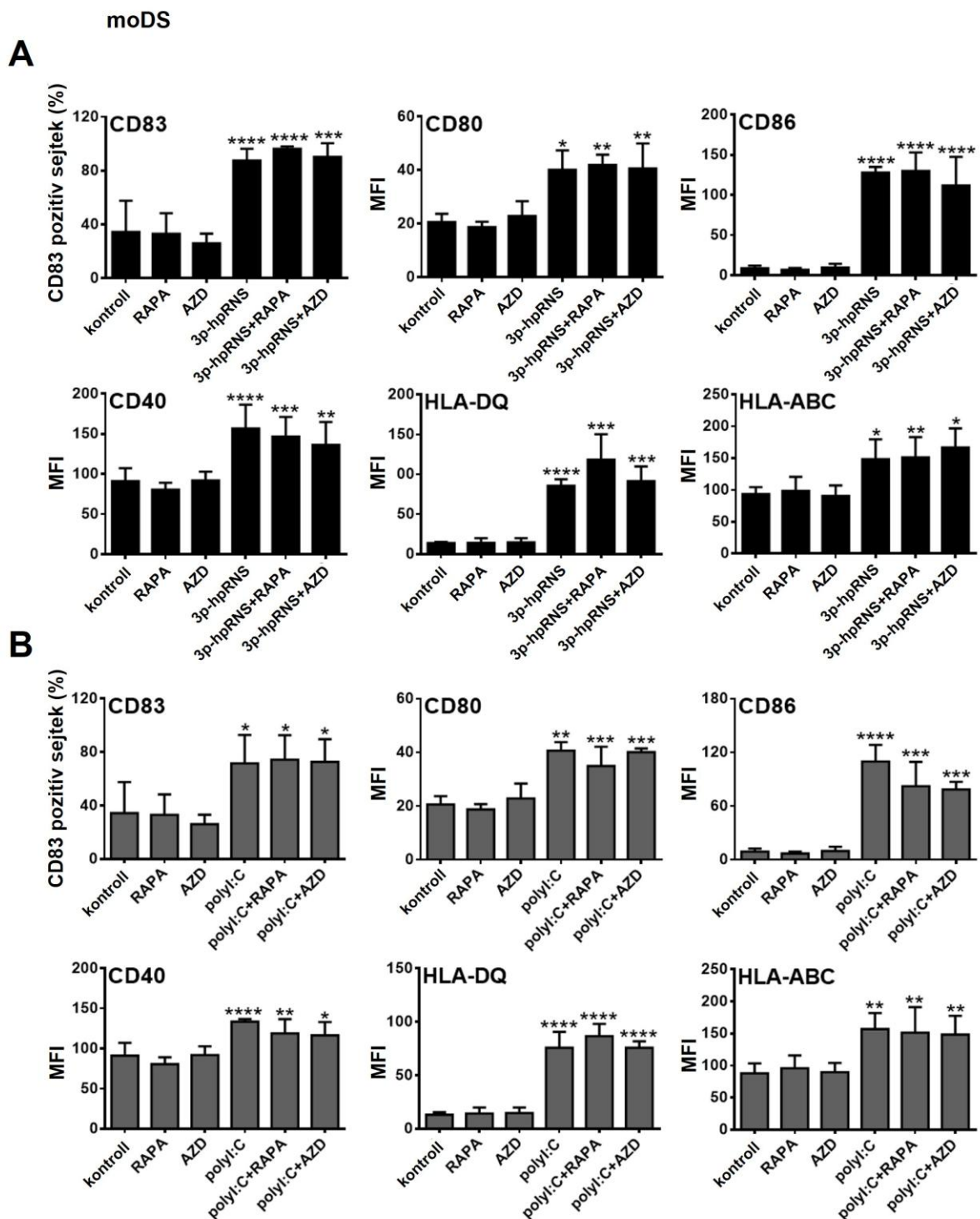
Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy a moDS-ek és a pDS-ek RIG-I általi aktivációjának különböző metabolikus feltételei vannak. Humán moDS-ekben a RIG-I aktiváció oxidatív foszforilációról glikolízisre történő metabolikus váltást eredményez, ami elősegíti a sejtek I-es típusú IFN termelését és fokozza T-sejt aktiváló képességüket. Ezzel szemben a pDS-ek RIG-I által közvetített vírusellenes válasza nem igényel glikolízisre való átállást [190]. Továbbá ismert az is, hogy az mTOR aktiváció segíti a glikolízist a DS-ekben TLR stimulációt követően [191]. Ugyanakkor az irodalomban még nem volt adat arra nézve, hogy az mTOR milyen szerepet tölthet be az RLR-stimulált moDS-ek metabolikus átprogramozásában. Ezért a továbbiakban mTOR gátlók jelenlétében megvizsgáltuk a 3p-hpRNS-sel vagy polyI:C/LyoVecTM komplex-szel aktivált moDS-ek glikolízissel összefüggő génjeinek, úgymint az *LDHA*-nak, a *HK2*-nek és a *HIF1A*-nak az expresszióját Q-PCR módszerrel mRNS szinten, valamint vizsgáltuk a laktát koncentrációt is a sejtek felülúszójában (**14. A-D ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy a 3p-hpRNS vagy a polyI:C/LyoVecTM stimulált moDS-ekben jelentősen fokozódott a glikolitikus gének (*LDHA*, *HK2* és *HIF1A*) expressziója (**14. A,B ábra**) és a laktát termelődése is (**14. C,D ábra**), amit az mTOR inhibitorok minden esetben gátoltak (**14. A-D ábra**). Ezen eredmények arra utalnak, hogy az mTOR elengedhetetlen a moDS-ek RLR által közvetített glikolitikus átprogramozásához is.



14. ábra. Az RLR által közvetített glikolitikus átprogramozódás gátlódik a moDS-ekben mTOR inhibitorok jelenlétében. Az éretlen moDS-eket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) (A,C) vagy polyI:C-vel (1µg/ml) stimuláltuk. (B,D) 12 órán keresztül. (A,B) Az *LDHA*, *HK2* és *HIF1A* expresszióját mRNS szinten Q-PCR módszerrel határoztuk meg. Az oszlopdiagramok 4 független kísérlet átlagát ± SD-t ábrázolják. (C,D) A laktát koncentrációját a sejtek felülszójából detektáltuk. Az oszlopdiagramok 6 független kísérlet átlagát ± SD-t mutatják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$

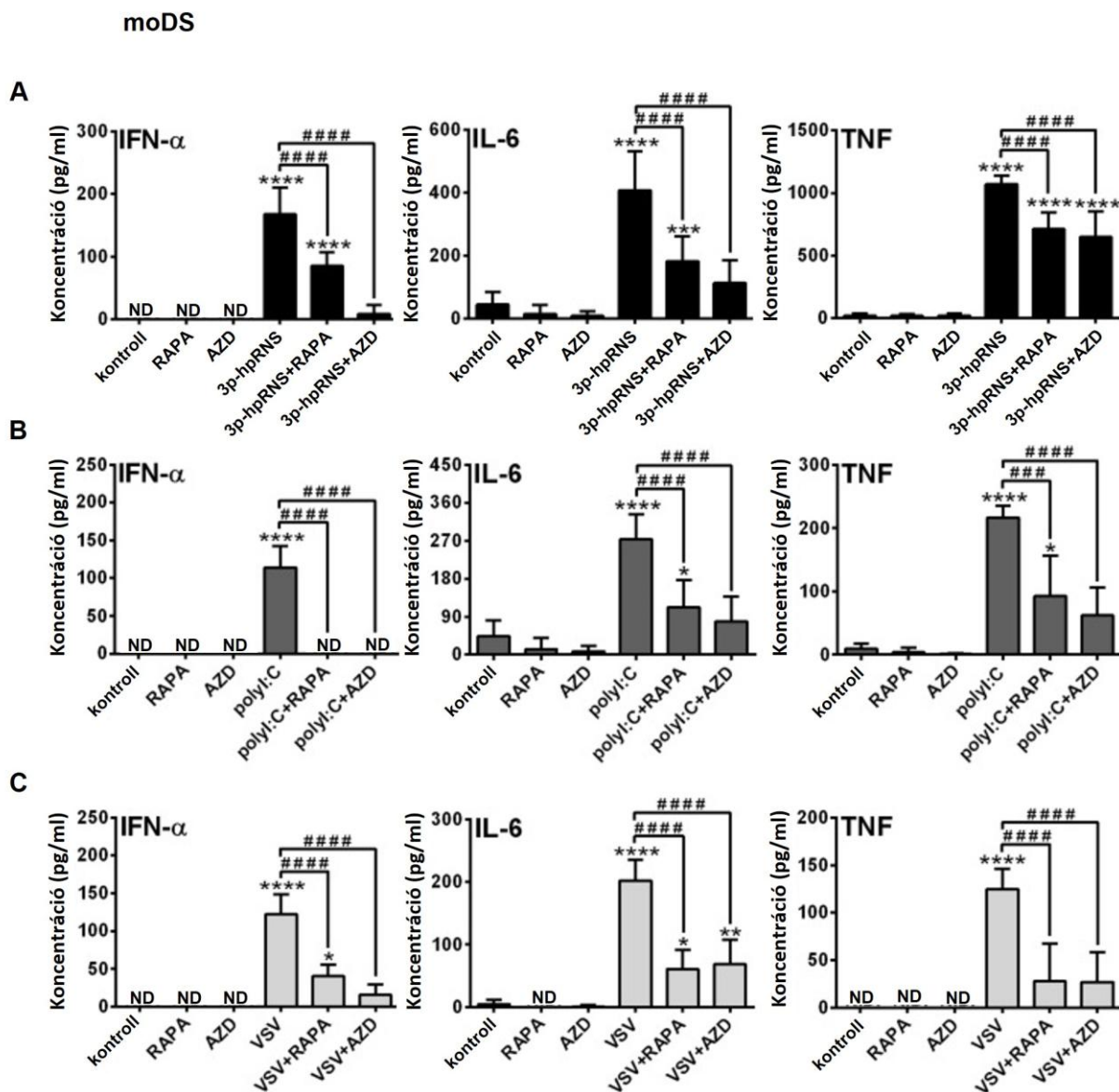
V.1.3 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata az RLR-stimulált humán moDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban

Mivel kimutattuk, hogy a moDS-ek RLR-aktivációjához szükséges energiát biztosító glikolitikus átprogramozás mTOR függő, a továbbiakban megvizsgáltuk az mTOR szerepét az RLR-stimulált moDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban. A rapamycinnel vagy AZD8055-tel történő előkezelést követően a sejteket 24 órán át 3p-hpRNS-sel vagy polyI:C/LyoVecTM stimuláltuk, majd vizsgáltuk a CD83 aktivációs marker, a kostimuláló CD40, CD80 és CD86 molekulák, valamint az MHC molekulák, úgymint a HLA-DQ és HLA-ABC expresszióját áramlási citometriával **(15. A,B ábra)**. Eredményeink szerint az mTOR gátlók önmagukban nem befolyásolták ezen fehérjéknek az alapszintű expresszióját a sejteken, viszont az RLR agonisták, azaz a 3p-hpRNS és a polyI:C/LyoVecTM jelentősen növelték a moDS-ek sejtfelszíni aktivációs molekuláinak a kifejeződését. Ugyanakkor sem a rapamycin, sem az AZD8055 nem volt képes szignifikánsan gátolni a moDS-ek RLR stimuláció indukált fenotípusos érését **(15. A,B ábra)**.



15. ábra. Az mTOR gátlása nem befolyásolja a moDS-ek RLR-közvetített fenotípusos érést. Az éretlen moDS-eket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) **(A)** vagy polyI:C-vel (1 µg/ml) **(B)** stimuláltuk 24 órán át. A sejtfelszíni molekulák expressziós szintjének változását áramlási citometriával vizsgáltuk. Az oszlopdiagramok legalább 4 független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ a kontrollhoz képest. MFI: medián fluoreszcencia intenzitás.

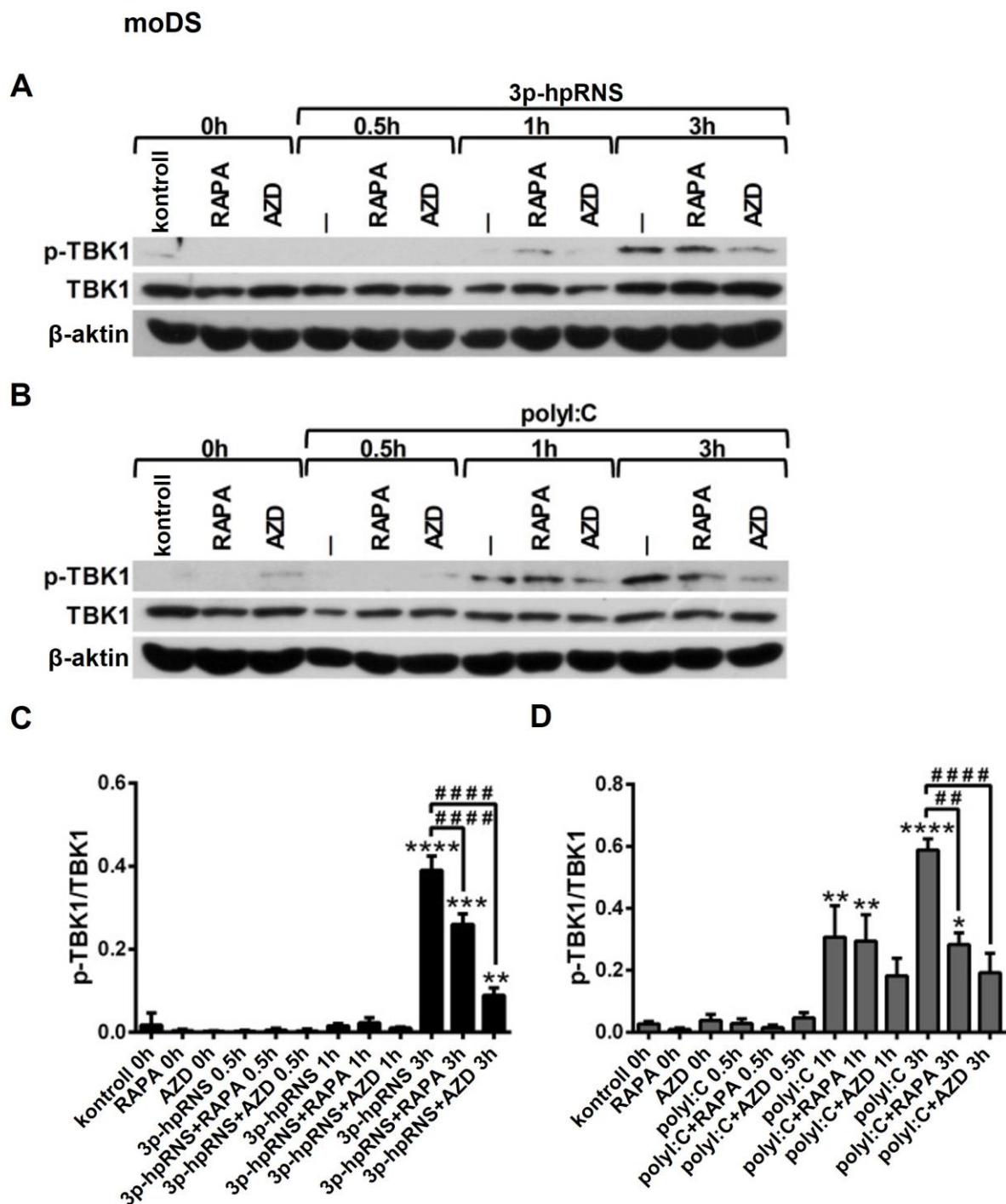
Következő lépésben a rapamycinnel vagy AZD8055-tel előkezelt és a RIG-I specifikus agonistájával, a 3p-hpRNS-sel vagy a RIG-I/MDA5 agonistájával, a polyI:C/LyoVecTM komplex-szel aktivált moDS-ek felülszójában vizsgáltuk a termelt citokinek koncentrációját 24 órás aktivációt követően ELISA módszer segítségével. A vizsgált citokinek között szerepelt a fő antivirális mediátor, az I-es típusú IFN-okhoz tartozó IFN- α , valamint az IL-6 és TNF pro-inflammatórikus citokinek. Megállapítottuk, hogy a kezeletlen moDS-ek nem szekretálják az I-es típusú IFN-okat, és gyulladásos citokineket is csak nagyon kis mértékben termelnek, melyek alapszintjét az mTOR gátlás nem befolyásolja. Ugyanakkor a 3p-hpRNS vagy a polyI:C/LyoVecTM kezelés mellett nagymértékben indukálódott az IFN- α , IL-6 és TNF citokinek termelődése a moDS-ekben, melyet az mTOR gátlása szignifikánsan csökkentett **(16. A,B ábra)**. Megfigyeléseink megerősítése érdekében ezen kísérleteinket elvégeztünk élő vírussal is. A moDS-ek aktivációjához élő VSV vírust használtunk, melynek RNS genomja főként az RLR-eken történő aktivációt biztosítja [192]. A rapamycinnel vagy AZD8055-tel előkezelt moDS-eket 1 MOI koncentrációban kezeltük a VSV-vel, majd 18 óra inkubálást követően mértük a sejtek citokin termelését. A szintetikus ligandumokhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a VSV fertőzés fokozta az IFN- α , IL-6 és TNF citokinek termelődését a sejtekben, melyet a rapamycin és az AZD8055 az mTOR gátlása révén jelentősen csökkentett **(16. C ábra)**. Így összeségében elmondható, hogy az mTOR gátlása nem befolyásolja a moDS-ek fenotípusos érését, viszont az aktivált moDS-ek citokin termelése mTOR függést mutat.



16. ábra. A moDS-ek RLR-aktiváció indukált citokin termelése mTOR gátlás hatására csökken. Az éretlen moDS-eket előkezeltük 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-sel (AZD) 2 órán át, majd 3p-hpRNS-sel (0,5µg/ml) (A), vagy polyI:C-vel (1µg/ml) (B), vagy VSV-vel (MOI 1) stimuláltuk (C). Az IFN-α, IL-6, TNF koncentrációját ELISA-val mértük 24 órával a 3p-hpRNS és polyI:C aktiváció után, valamint 18 órával a VSV stimuláció után. Az adatokat 5-8 független kísérlet átlagát ±SD-jét mutatják. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 a kontrollhoz képest, ####p<0,001, #####p<0,0001. ND: nem detektálható.

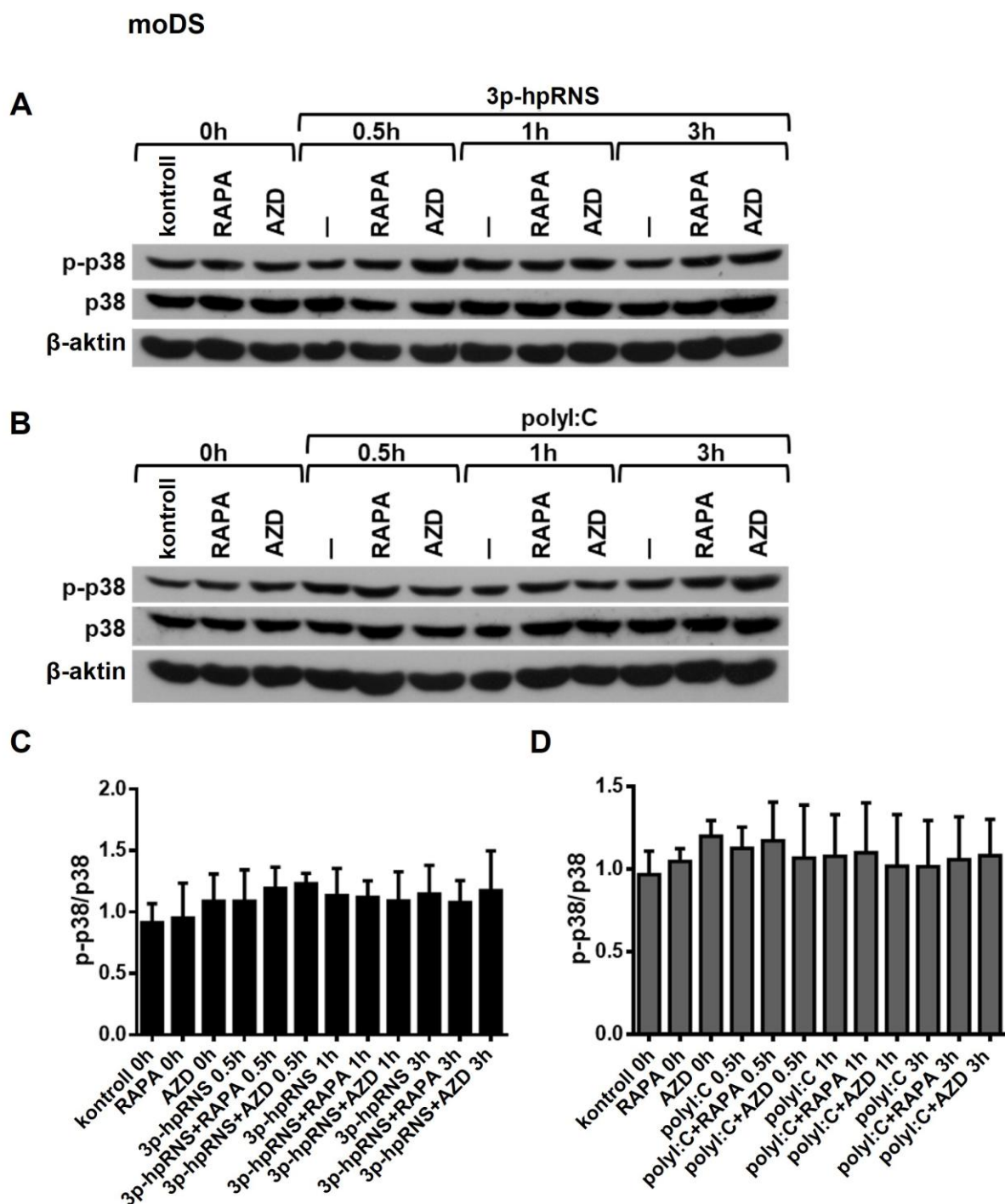
A TBK1 szerin/treonin-protein kináz a RIG-I/MDA5-MAVS útvonal kulcsfontosságú szabályozója. Az RLR stimuláció, a receptorkomplex aktiválása után egy molekuláris kaszkádot indít el, mely a TBK1 foszforilációjával jár a szerin-172-es pozíciójában. Az aktivált TBK1 és az IKKε közvetlenül foszforilálja az IRF3 és IRF7 transzkripció

faktorokat, mely vírusellenes citokinek termelődését eredményezi. Továbbá A RIG-I/MDA5-MAVS-on keresztül aktiválja az IkappaB kináz komplexet (IKK) is, ami az NF- κ B útvonalon indukálja a pro-inflammatorikus citokinek termelődéséhez szükséges gének aktiválódását [194,195]. Így, mivel a TBK1-nek kiemelt szerepe van az RLR jelátvitelben, megvizsgáltuk a TBK1 foszforiláció kinetikáját mTOR inhibitorok jelenlétében western blot módszerrel (**17. A,B ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy az RLR agonistákkal történő kezelés időfüggő módon fokozza a TBK1 foszforiláció szintjét a moDS-ekben. Mind a 3p-hpRNS, mind polyI:C/LyoVecTM kezelés 3 óra elteltével eredményezi a TBK1 fehérjének a foszforilációs csúcsát. Ugyanakkor az RLR aktiváció indukált TBK1 foszforiláció szignifikánsan csökkent, ha a sejteket aktivációt megelőzően mTOR inhibitorokkal kezeltük elő (**17. A-D ábra**). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy az mTOR gátlók valószínűleg a TBK1 aktivitás gátlása révén voltak képesek szignifikánsan csökkenteni az RLR aktiváció indukált citokin termelést a moDS-ekben.



17. ábra. Az RLR aktiváció fokozza a TBK1 aktivitást a moDS-ekben, amit a rapamycin és az AZD8055 előkezelés csökkentett. Az éretlen moDS-eket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 μ g/ml) (A,C) vagy polyI:C-vel (1 μ g/ml) (B,D) stimuláltuk különböző inkubációs idők mellett. A TBK1 foszforiláció kinetikáját western blottal határoztuk meg. (A,B) paneleken reprezentatív blotok láthatók. (C,D) Az oszlopdiagramok legalább 3 független kísérlet átlagát $\pm$ SD-t ábrázolják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a mieloid DS-ek vírus fertőzése során a p38 MAPK útvonal is aktiválódik a RIG-I receptor aktiválódása kapcsán és a p38 aktiválódása elősegíti az I-es típusú IFN-ok és az IL-12 gyulladásos citokin termelődését. Ezáltal a p38 MAPK útvonal szintén meghatározó szereppel bír az antivirális immunválasz első vonalának kialakításában és az adaptív immunitás beindításában. A p38 MAPK-t a mitogén által aktivált protein kinázok (MKK3/MKK6) és az extracelluláris szignál által szabályozott kináz (ERK) aktiválja a tirozin 180-as és 182-es foszforilációja révén [195]. Munkánk során kíváncsiak voltunk arra, hogy az mTOR gátlás a TBK1 foszforiláció mellett a p38 MAPK foszforilációját is befolyásolja-e, így az éretlen moDS-eket 3p-hpRNS-sel (**18. A,C ábra**) vagy polyI:C/LyoVecTM-vel (**18. B,D ábra**) időfüggő módon stimuláltuk és elemeztük, hogy a 2 órás mTOR inhibitorokkal való előkezelés utáni RLR stimulációk hatására hogyan változik a p38 (Thr180/Tyr182) foszforilációjának a szintje. Azonban a moDS-ek esetében azt tapasztaltuk, hogy a p38 foszforilációja alap szinten is magas a sejtekben, amit sem az RLR agonistákkal, sem az mTOR gátlókkal történő kezelés nem változtatott meg szignifikánsan (**18. A-D ábra**). Így összességében elmondható, hogy moDS-ekben az mTOR komplex főként a TBK1 aktivitás szabályozása révén befolyásolhatja a sejtek citokin termelését.



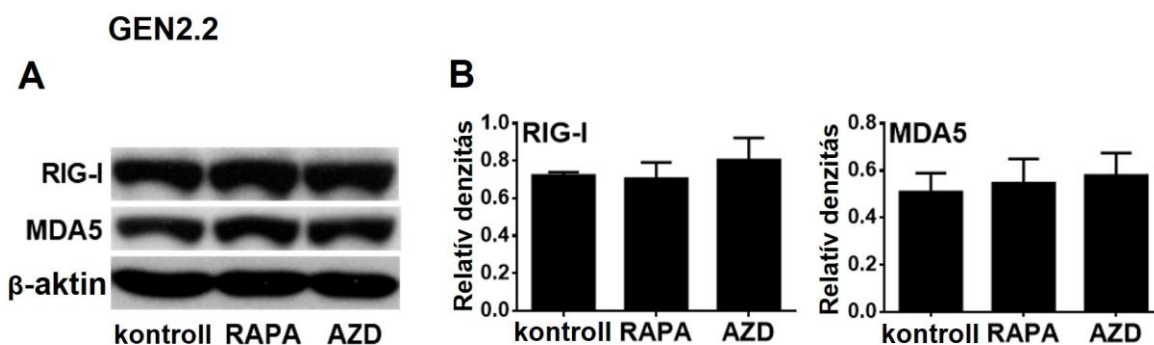
18. ábra. A p38 foszforilációját nem befolyásolja az RLR aktiváció vagy az mTOR gátlás **moDS**-ekben. Az éretlen **moDS**-eket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 óráan át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) (**A,C**) vagy polyI:C-vel (1 µg/ml) (**B,D**) stimuláltuk időfüggő módon. A p38 foszforilációjának kinetikáját western blottal határoztuk meg. (**A,B**) A reprezentatív blotok láthatók. (**C,D**) Az oszlopdiagramok legalább 3 független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják.

V.1.4 Az mTOR aktivitás vizsgálata az RLR aktivált humán pDS-ekben

A pDS-ek vírusfertőzéskor képesek gyorsan, nagy mennyiségű I-es típusú IFN-okat termelni, valamint egyéb gyulladásos citokineket is szekretálni [196]. A pDS-ek TLR-ek által közvetített vírusellenes válaszaiban az mTOR szabályozó szerepét korábban már feltárták [58], ugyanakkor az RLR közvetített antivirális válaszok mTOR függését még nem tanulmányozták, holott az RLR-eknek is kiemelkedő szerepe van a sejtekben aktívan replikálódó vírusok felismerésében [192].

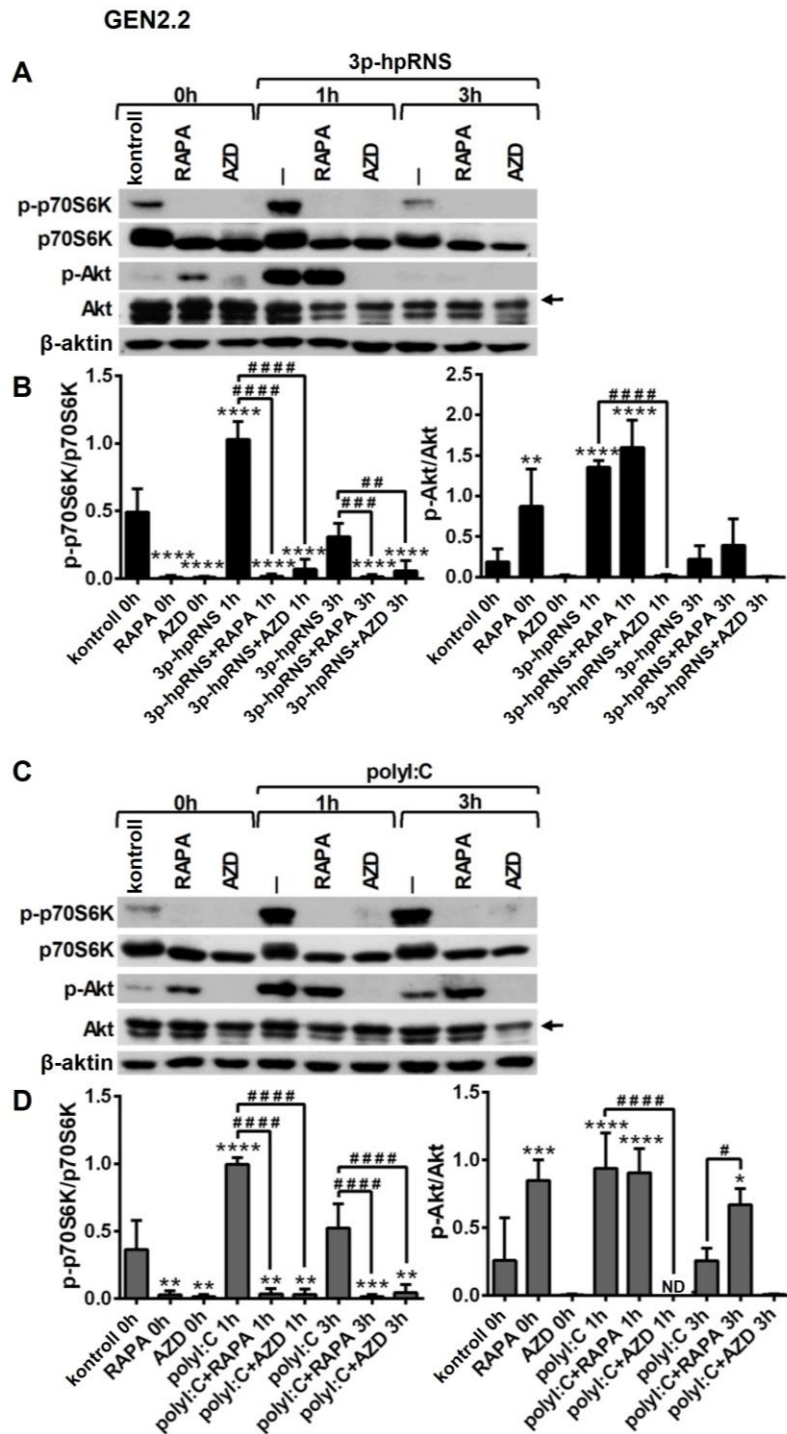
A humán perifériás vérben keringő pDS-ek száma korlátozott, ezért kísérleteink nagy részét a humán GEN2.2 pDS sejtvonallal végeztük, mely a primer humán pDS-ekhez hasonló fenotípusos és funkcionális tulajdonságokat mutat [197,198]. Korábban munkacsoportunk már leírta, hogy míg a cDS-ek és moDS-ek konstitutívan expresszálják az RLR-ket, addig a nyugvó pDS-ekben a RIG-I és az MDA5 receptorok egyáltalán nem, vagy csak nagyon kis mértékben fejeződnek ki. TLR7, TLR9 aktivációk nagymértékben fokozzák az RLR-ek expresszióját a pDS-ekben is [58]. Korábban leírtuk, hogy alacsony dózisu (0,25 μ M) TLR9 agonistával, azaz CpG-A-val történő 16 órás előkezelés elegendő ahhoz, hogy a pDS-ekben a RIG-I és az MDA5 receptorok indukálódjanak. Ez az alacsony dózisu CpG-A kezelés ugyanakkor még nem okoz IFN termelést a pDS-ekben, így nem vezet a pDS-ek kimerüléséhez [199]. Ezért a további kísérleteinkben a pDS-eseket hasonlóan kezeltük elő, hogy indukáljuk a RIG-I és MDA5 receptorokat a sejtekben, majd ezt követően vizsgáltuk az RLR aktiváció mTOR függését.

Először azt vizsgáltuk, hogy az mTOR-nak van-e szerepe a RIG-I és az MDA5 expressziójának szabályozásába, illetve, hogy az mTOR gátlása módosítja-e ezen receptorok expresszióját. A GEN2.2 sejteket 2 órán keresztül rapamycinnel vagy AZD8055-tel kezeltük, majd kis dózisu CpG-A-val indukáltuk a RIG-I és MDA5 receptorokat. Western blot analízisünk alapján elmondható, hogy az mTOR gátlása nem befolyásolta a RIG-I és az MDA5 receptorok aktiváció-indukált fehérje szintjét a GEN.2.2 sejtekben (**19. A,B ábra**). Így hasonlóan a moDS-ek esetében kapott eredményekhez az mTOR gátlás nem változtatja meg az RLR receptorok kifejeződését a sejtekben.



19. ábra. Az mTOR gátlása nem befolyásolja az RLR-ek fehérjeszintjét a GEN2.2 sejtekben. A GEN2.2 sejteket előkezeltük 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át, majd indukáltuk a RIG-I és MDA5 expressziót CpG-A-val és western blot analízissel vizsgáltuk a receptorok kifejeződését. **(A)** A reprezentatív blotok láthatók. **(B)** Az oszlopdiagramok a β-aktinra normalizált relatív densitás értékeket ábrázolják, és legalább 3 független kísérlet átlagát ± SD-t mutatják.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az mTOR aktivitás szükséges-e az RLR-eken keresztüli jelátvitel beindításához a pDS-ek esetében is. Így a pDS-eknél is megvizsgáltuk az mTORC1 és az mTORC2 downstream célpontjainak a p70S6K-nak (Thr389) és az Akt-nak (Ser473) a foszforilációját RLR aktivációt követően. A GEN2.2 sejtekben indukáltuk az RLR-ek expresszióját a korábban leírt módon, majd az RLR-ek specifikus aktivációját megelőzően a sejteket 2 órán át inkubáltuk 100 nM rapamycinnel vagy AZD8055-tel. A western blot analízis eredményei azt mutatták, hogy a moDS-ekhez hasonlóan a pDS-ek 3p-hpRNS-sel (**20. A,B ábra**) vagy polyI:C/LyoVecTM-vel (**20. C,D ábra**) történő kezelése is szignifikánsan megnövelte a p70S6K és Akt foszforilációját, ami a csúcsát 1 órás aktivációt követően érte el. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy az RLR-ek aktivációja a pDS-ek esetében is fokozza az mTOR aktivitást. Ugyanakkor a rapamycinnel végzett előkezelés gátolta a p70S6K foszforilációját az aktiválatlan és az aktivált sejtekben egyaránt. Az mTORC1/mTORC2 kettős inhibitor, az AZD8055 pedig blokkolta mindkét mTOR célmolekula foszforilációját (**20. A-D ábra**). Megállapítottuk továbbá, hogy a rapamycin kezelés önmagában az Akt foszforiláció növekedéséhez vezet, ami az mTORC1 és a p70S6K negatív visszacsatolási hurok elvesztésével magyarázható [200]. Ezen eredményeink összhangban vannak a moDS-ek esetében kapott adatokkal, így elmondható, hogy az mTOR fontos szabályozó szereppel bírhat az RLR által közvetített immunválaszok szabályozásában mind moDS-eknél, mind pDS-eknél.



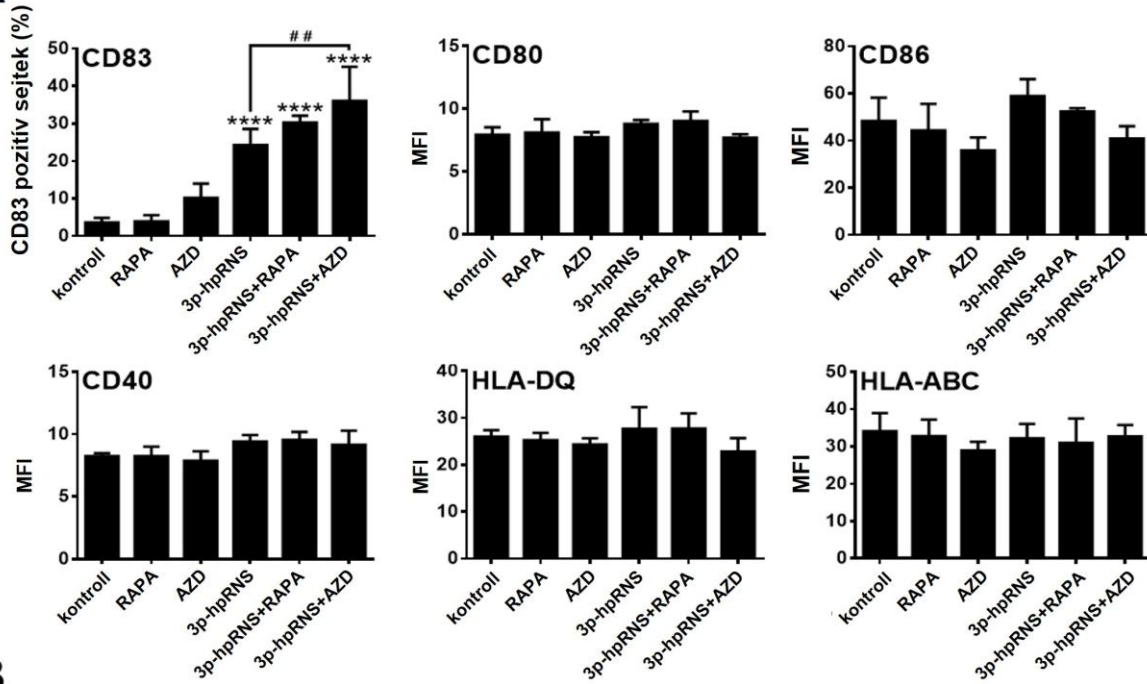
20. ábra. Az RLR stimuláció növeli az mTORC1 és mTORC2 aktivitást a GEN2.2 sejtekben, ami hatékonyan gátolható mTOR inhibitorokkal. A GEN2.2 sejteket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) (A,B) vagy polyI:C-vel (1 µg/ml) stimuláltuk (C,D) időfüggő módon. A p70S6K és Akt foszforiláció kinetikáját western blottal határoztuk meg. (A,C) A reprezentatív blotok láthatók. (B,D) Az oszlopdíagramok 4 független kísérlet átlagát ± SD-t ábrázolják. Az Akt-ra specifikus sávokat nyilak jelzik. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ a kontrollhoz képest; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$. ND: nem detektálható.

V.1.5 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata az RLR-aktivált humán pDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban

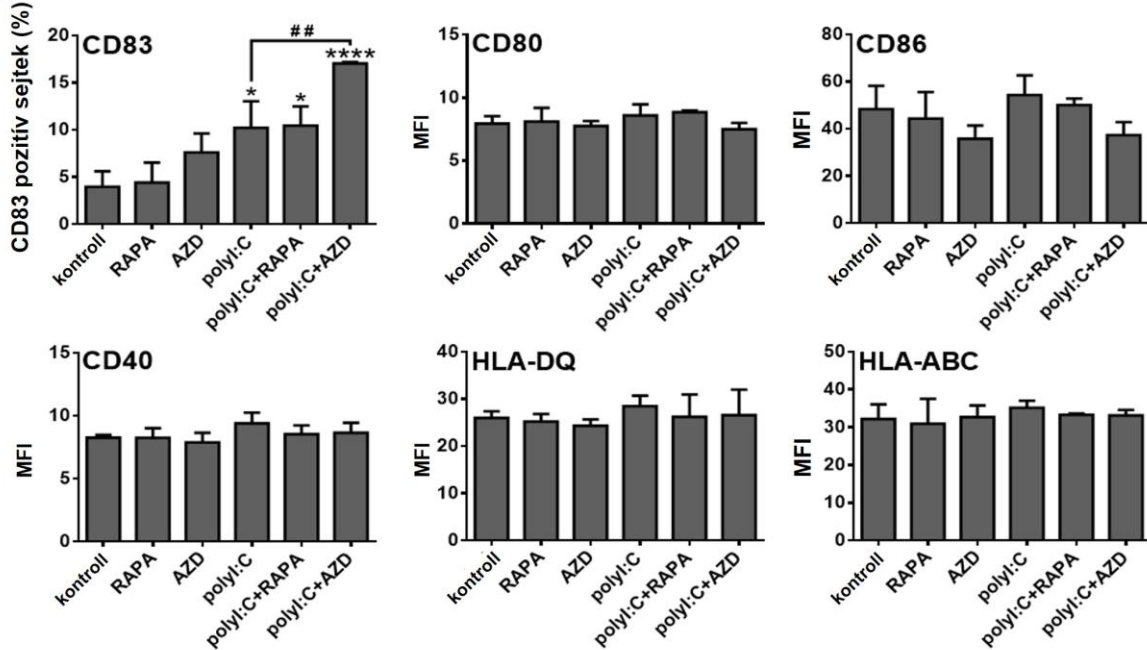
Mivel kimutattuk, hogy az RLR aktiváció mTOR aktivitással társul, a következőkben megvizsgáltuk, hogy az mTOR gátlása hogyan befolyásolhatja a pDS-ek RLR-indukálta fenotípusos és funkcionális változásait. Így a rapamycinnel vagy AZD8055-tel történő 2 órás előkezelést követően a GEN2.2 sejteket 3p-hpRNS-sel **(21. A ábra)** vagy polyI:C/LyoVecTM **(21. B ábra)** komplex-szel kezeltük, majd 24 óra inkubációt követően megvizsgáltuk ugyanazon sejtfelszíni aktivációs markerek expresszióját, mint amiket korábban a moDS-ek esetében is vizsgáltunk áramlási citometriával. A moDS-ekkel ellentétben az RLR aktiváció a GEN2.2 sejtek esetében nem fokozta a CD40, CD80 és CD86 kostimulációs és a HLA antigén-prezentáló molekulák expressziós szintjeit és a moDS-ekhez hasonlóan az mTOR inhibitorokkal történő előkezelés sem eredményezett különbséget ezen fehérjék expressziós szintjeiben. Ezzel ellentétben RLR aktiváció következtében jelentősen megnőtt a CD83 aktivációs marker szintje, ami érdekes módon az AZD8055-tel előkezelt sejtek esetében tovább fokozódott, mely az mTOR valamilyen szelektív szabályozó mechanizmusára utalhat a pDS-ekben **(21. A,B ábra)**.

GEN2.2

A



B

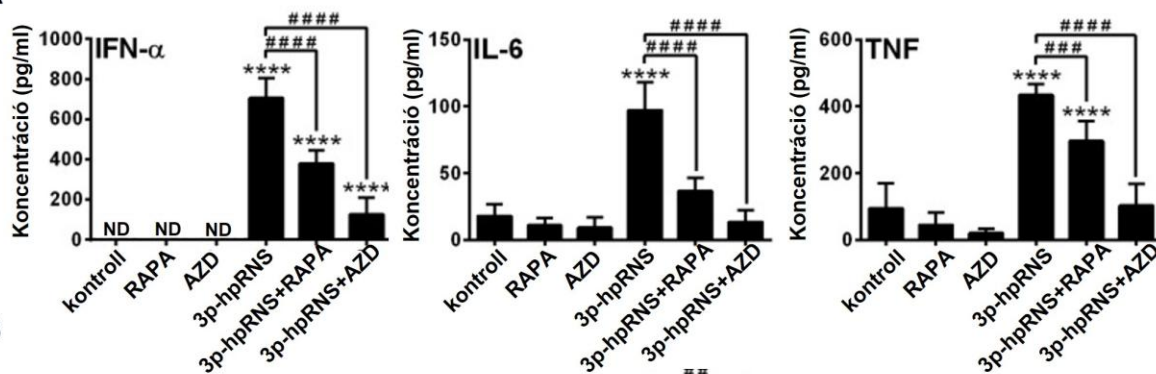


21. ábra. A sejtfelszíni molekulák expresszióját csak kismértékben és szelektíven modulálja az mTOR gátlása az RLR aktivált GEN2.2 sejtekben. RLR indukciót követően a GEN2.2 sejteket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) **(A)** vagy polyI:C-vel stimuláltuk (1 µg/ml) **(B)** 24 órán keresztül. A sejtfelszíni molekulák expressziós szintjében bekövetkezett változásokat áramlási citometriával elemeztük. Az oszlopdiagramok legalább 4 független kísérlet átlagát ±SD-jét ábrázolják. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$. MFI: medián fluoreszcencia intenzitás.

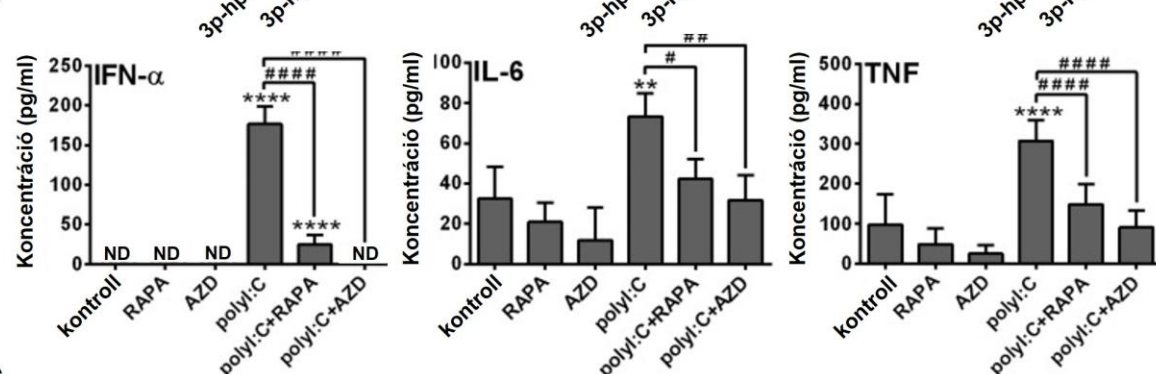
Ezt követően megvizsgáltuk az RLR aktivált GEN2.2 sejtek IFN- α szekrécióját, és mivel a pDS-ek vírusfertőzés hatására pro-inflammatorikus citokinek termelésére is képesek ezért az IL-6 és TNF pro-inflammatorikus citokinek szekrécióját is az mTOR gátlása mellett. A sejteket elsőként az RLR receptorok szintetikus ligandjaival, 3p-hpRNS-sel vagy polyI:C/LyoVecTM komplex-szel aktiváltuk mTOR inhibitorok mellett és ELISA módszer segítségével meghatároztuk a termelt citokinek koncentrációját a sejtek felülúszójából. Kapott eredményeink összhangban vannak a moDS-ek esetében tapasztalt változásokkal, miszerint az IFN- α , IL-6 és TNF citokinek szekréciója jelentősen megnőtt az RLR-stimuláció hatására **(22. A,B ábra)**. Ugyanakkor az RLR-stimulált GEN2.2 sejtekben az mTOR inhibitorok szignifikánsan csökkentették az IFN- α és a gyulladásgátló citokinek termelődését **(22. A,B ábra)**. Eredményeink további megerősítése érdekében hasonlóan az moDS vizsgálathoz, az élő vírussal fertőzött GEN2.2 sejtek citokin termelését is megvizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy az mTOR gátlása nagymértékben csökkenti a sejtek VSV által indukált citokin szekrécióját is **(22. C ábra)**. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az mTOR fontos szabályozó szerepet tölt be a pDS-ek RLR-közvetített I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus citokin válaszaiban, hasonlóan a moDS-ekhez.

GEN2.2

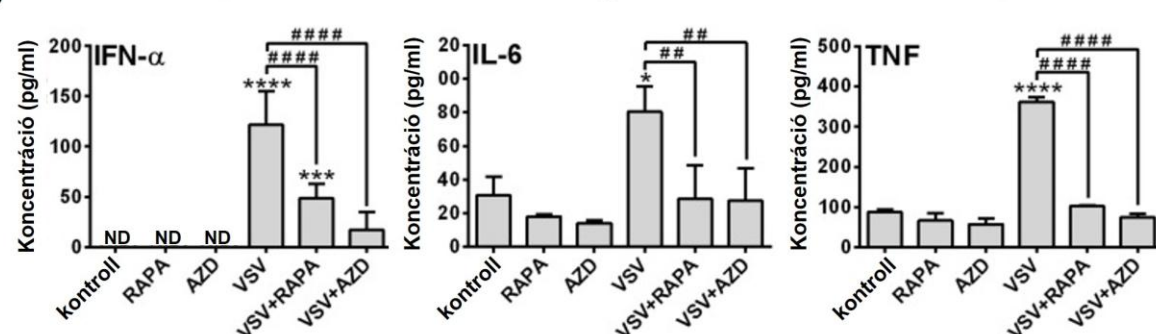
A



B

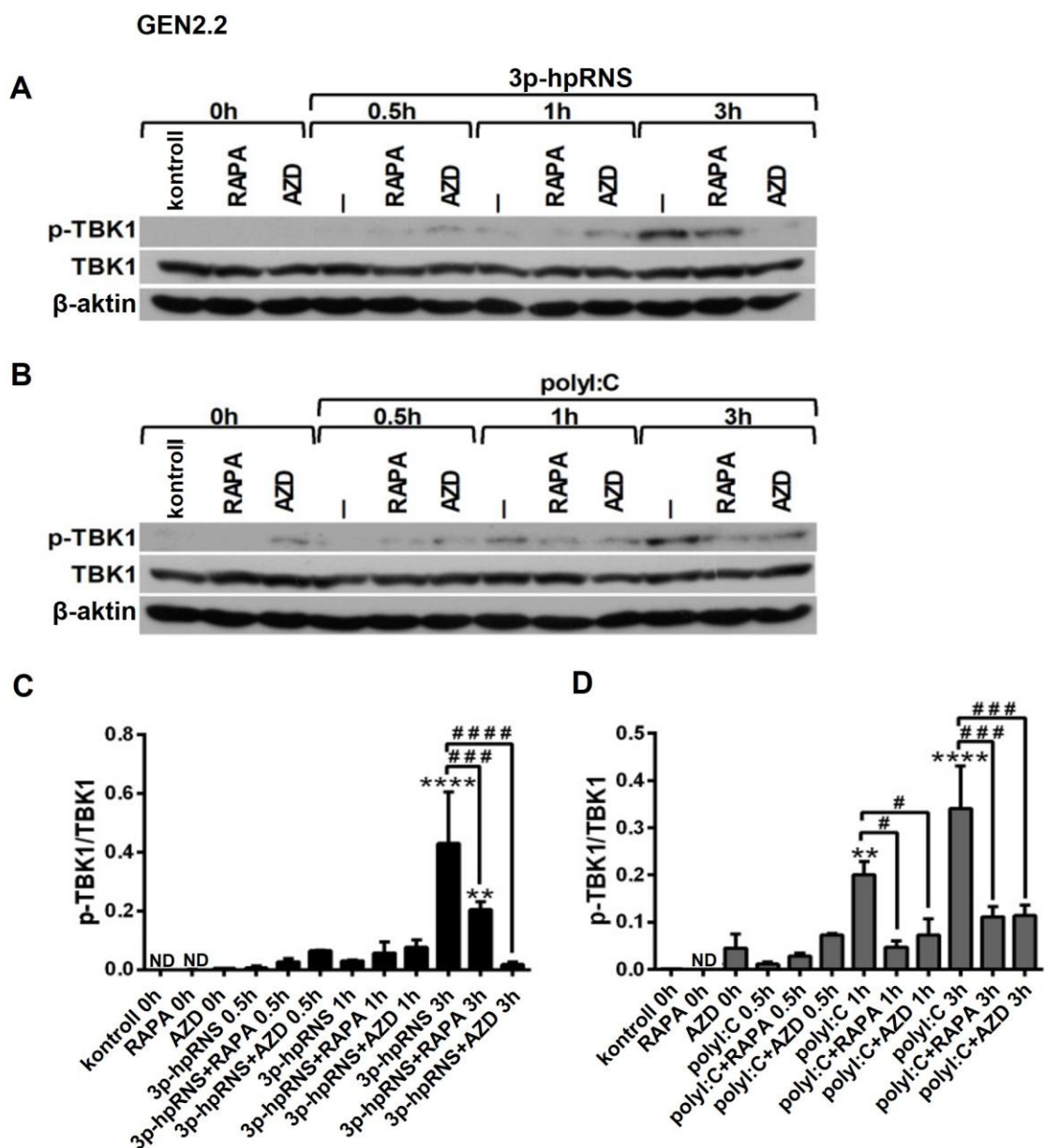


C



22. ábra. Az IFN- α és a gyulladásos citokinek RLR aktiváció indukált termelődése csökken az mTOR gátlása mellett GEN2.2 sejtekben. Az RLR-eket expresszáló GEN2.2 sejteket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 μ g/ml) (A), vagy polyI:C-vel (1 μ g/ml) (B), vagy vezikuláris stomatitis vírussal (VSV; MOI 1) (C) stimuláltuk. (A–C) Az IFN- α , IL-6 és TNF citokineket ELISA-val mértük 6 órával a 3p-hpRNS vagy a polyI:C aktiváció után vagy 18 órával a VSV stimuláció után. Az adatokat átlag $\pm$ SD-ként mutatjuk be 4-8 független kísérletből. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$. ND: nem detektálható.

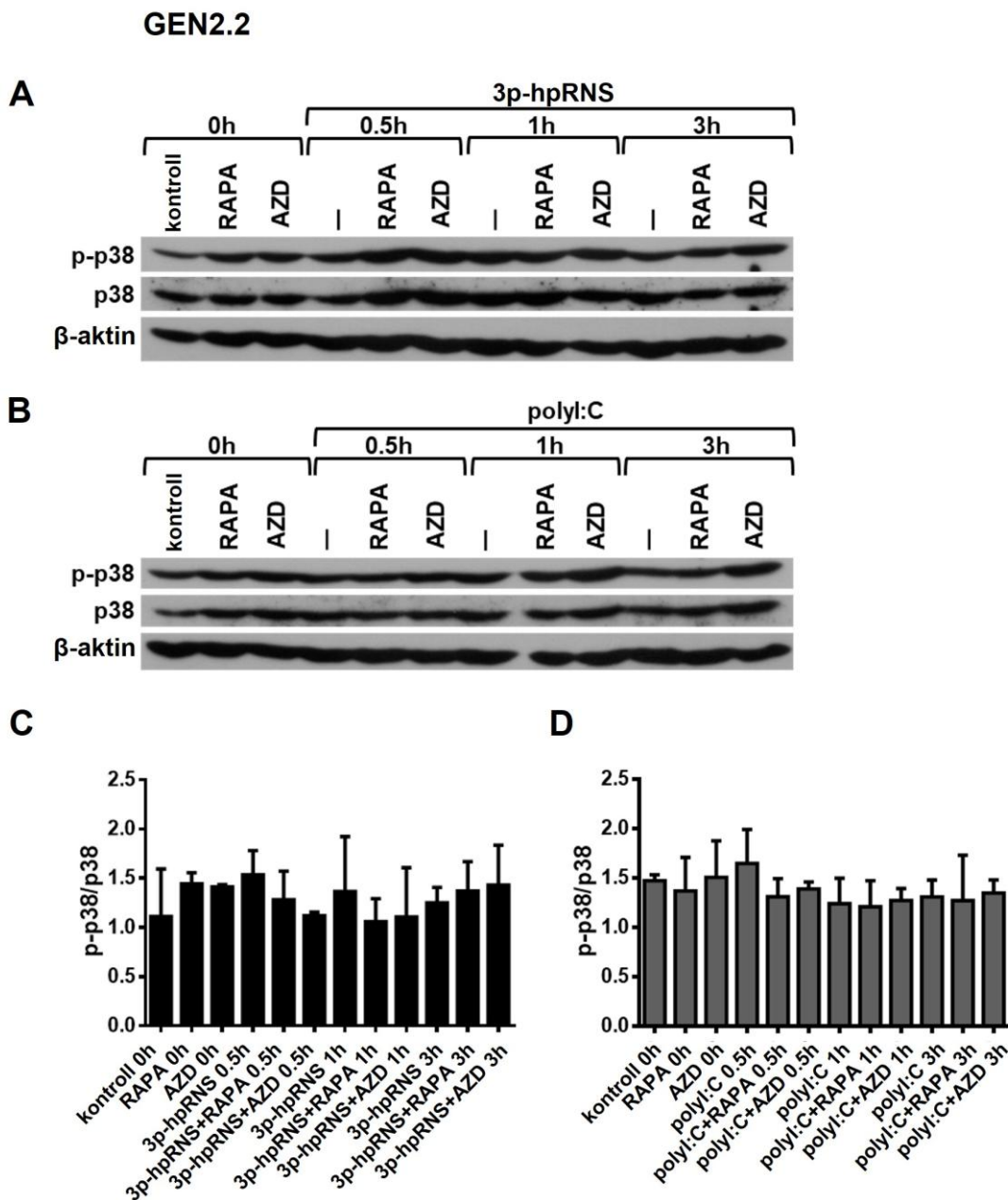
Mivel korábban láttuk, hogy az mTOR a TBK1-en keresztül szabályozta a moDS-ek RLR aktiváció indukált funkcióit, a pDS-ek esetében is meg kívántuk vizsgálni a TBK1 foszforilációt mTOR inhibitorok jelenlétében. Az RLR-eket expresszáló GEN2.2 sejteket különböző inkubációs idők mellett (0,5h, 1h, 3h) stimuláltuk a 3p-hpRNS **(23. A,C ábra)** vagy polyI:C/LyoVecTM **(23. B,D ábra)** RLR-ligandumokkal, 2 órás rapamycin vagy AZD8055 mTOR inhibitorokkal történő előkezelést követően és vizsgáltuk a TBK1 foszforiláció kinetikáját western blot módszer segítségével. Eredményeink azt mutatták, hogy az RLR aktiváció indukálja a TBK1 foszforilációját, ami 3 óránál érte el a csúcsát. A TBK1 foszforilációja ugyanakkor jelentősen csökkent az mTOR gátlás következtében. Ezek az adatok a moDS-ekhez hasonlóan azt mutatják, hogy az mTORC1 és az mTORC2 gátlása pDS-ekben sem befolyásolja az RLR-aktivált sejtek fenotípusos változásait, ugyanakkor csökkenti a citokin termelődésüket, valószínűleg a TBK1 aktivitás gátlása révén **(23. A-D ábra)**.



23. ábra. Az RLR aktiváció fokozza a TBK1 foszforilációját, melyet a rapamycin és AZD8055 előkezelés csökkent a GEN2.2 sejtekben. Az RLR-t expresszáló GEN2.2 sejteket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) (A,C) vagy polyI:C-vel (1 µg/ml) (B,D) stimuláltuk időfüggő módon. A TBK1 foszforiláció kinetikáját western blottal határoztuk meg. (A,B) A reprezentatív blotok láthatók. (C,D) Az oszlopdiagramok legalább 3 független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$. ND: nem detektálható.

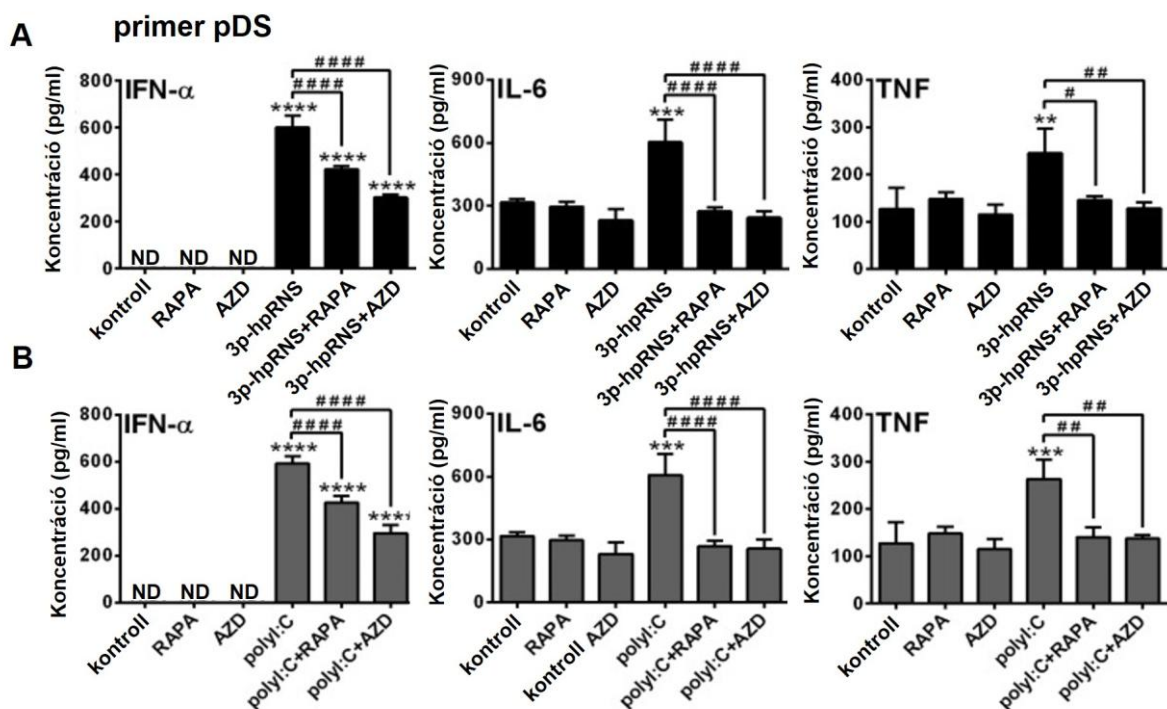
Ezt követően a p38 foszforilációs szintet vizsgálva a GEN2.2 sejtekben, ugyanazt az eredményt kaptunk, mint moDS-eknél. A p38 foszforiláció szintje a GEN2.2 sejtek esetében

sem változott szignifikánsan RLR stimuláció hatására és az mTOR gátlás sem befolyásolta a foszforiláció szintjét (**24. A-D ábra**). Így a moDS-ek és pDS-ek esetében is elmondható, hogy az mTOR gátlás főként a TBK1 aktivitás szabályozása révén befolyásolhatja az RLR aktiváció mediált citokin termelést.



24. ábra. A p38 foszforiláció szintje nem változott RLR stimuláció vagy mTOR gátlás hatására GEN2.2 sejtekben. A sejteket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 µg/ml) (**A,C**) vagy polyI:C-vel (1 µg/ml) (**B,D**) stimuláltuk időfüggő módon. A p38 foszforilációjának kinetikáját western blottal határoztuk meg. (**A,B**) A reprezentatív blotok láthatók. (**C,D**) Az oszlopdiagramok legalább 3 független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják.

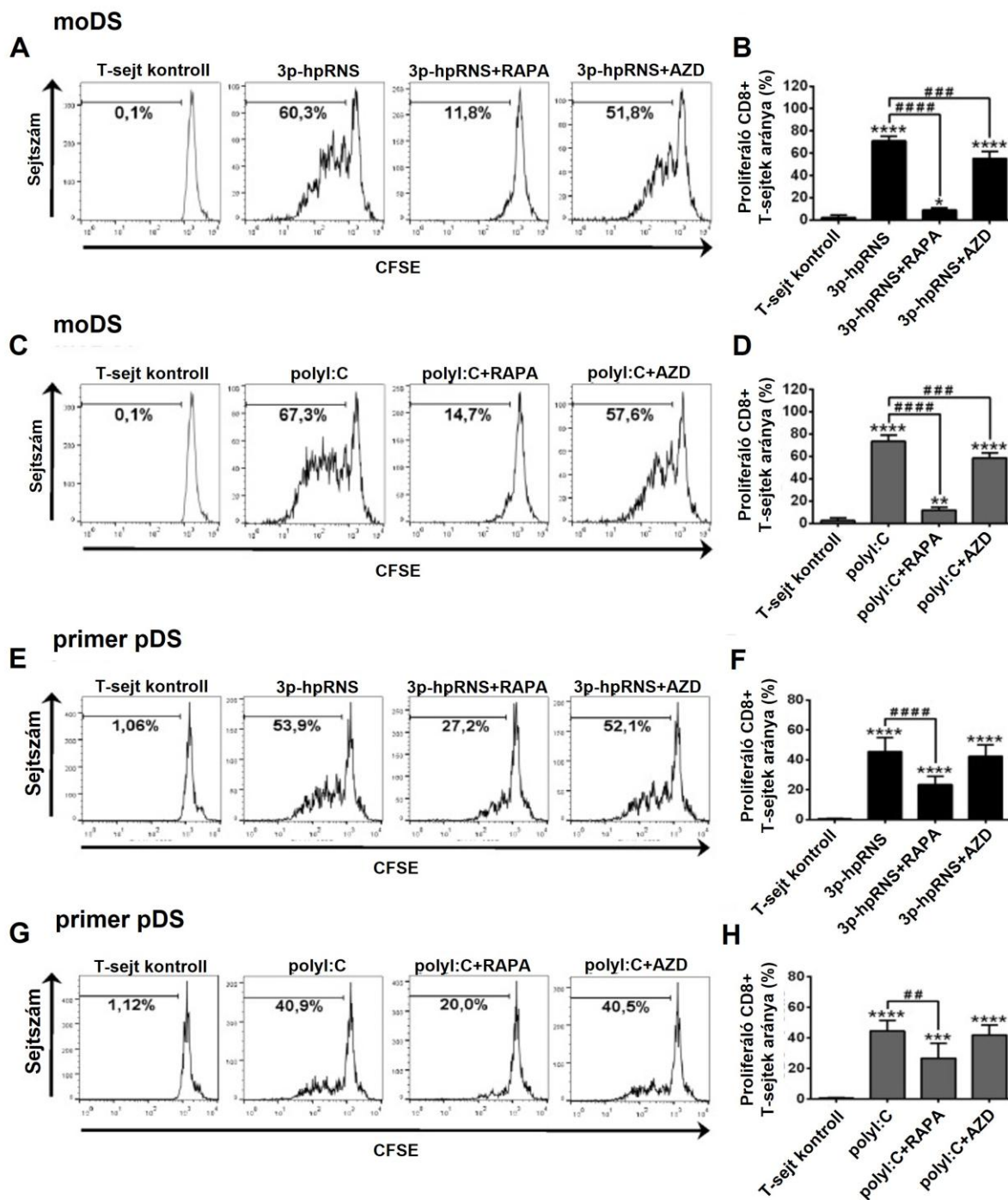
A GEN2.2 pDS sejtvonalon kapott eredményeink megerősítése céljából az RLR-mediált citokin termelés mTOR függését egészséges véradók perifériális véréből izolált primer pDS-ekben is megvizsgáltuk. A primer pDS-eket mTOR gátlók jelenlétében vagy hiányában 3p-hpRNS-sel (**25. A ábra**) vagy polyI:C/LyoVecTM-vel (**25. B ábra**) stimuláltuk, majd 6 óra inkubációt követően ELISA módszerrel mértük a sejtek által termelt citokinek koncentrációját a sejt kultúrák felülúszójában. A GEN2.2 sejteken végzett megfigyeléseinkkel összhangban az mTOR gátlása a specifikus mTORC1 gátlóval, a rapamycinnel vagy az mTORC1/mTORC2 kettős gátlóval, az AZD8055-tel nem befolyásolta az aktiválatlan primer pDS-ek IFN- α , IL-6 és TNF szekrécióját. Ugyanakkor az RLR stimuláció által indukált citokin termelést az mTORC1 és a kettős mTORC1/mTORC2 gátlás egyaránt csökkentette (**25. A,B ábra**). Ezen eredményeink megerősítik, hogy az mTOR fontos szabályozó szerepet játszik a humán pDS-ek RLR-közvetített I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus citokin válaszaiban.



25. ábra. Az IFN- α és a pro-inflammatorikus citokinek RLR aktiváció indukált szekréciója gátlódik primer pDS-ekben mTOR inhibitorok jelenlétében. A primer pDS-eket 100 nM rapamycinnel (RAPA) vagy 100 nM AZD8055-tel (AZD) 2 órán át előkezeltük, majd 3p-hpRNS-sel (0,5 μ g/ml) (**A**) vagy polyI:C-vel (1 μ g/ml) (**B**) stimuláltuk. Az IFN- α , IL-6 és TNF citokin szinteket ELISA-val mértük 6 órával a stimuláció után. Az adatokat 3 független kísérlet átlag $\pm$ SD értékben mutatjuk be. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$. ND.: nem detektálható.

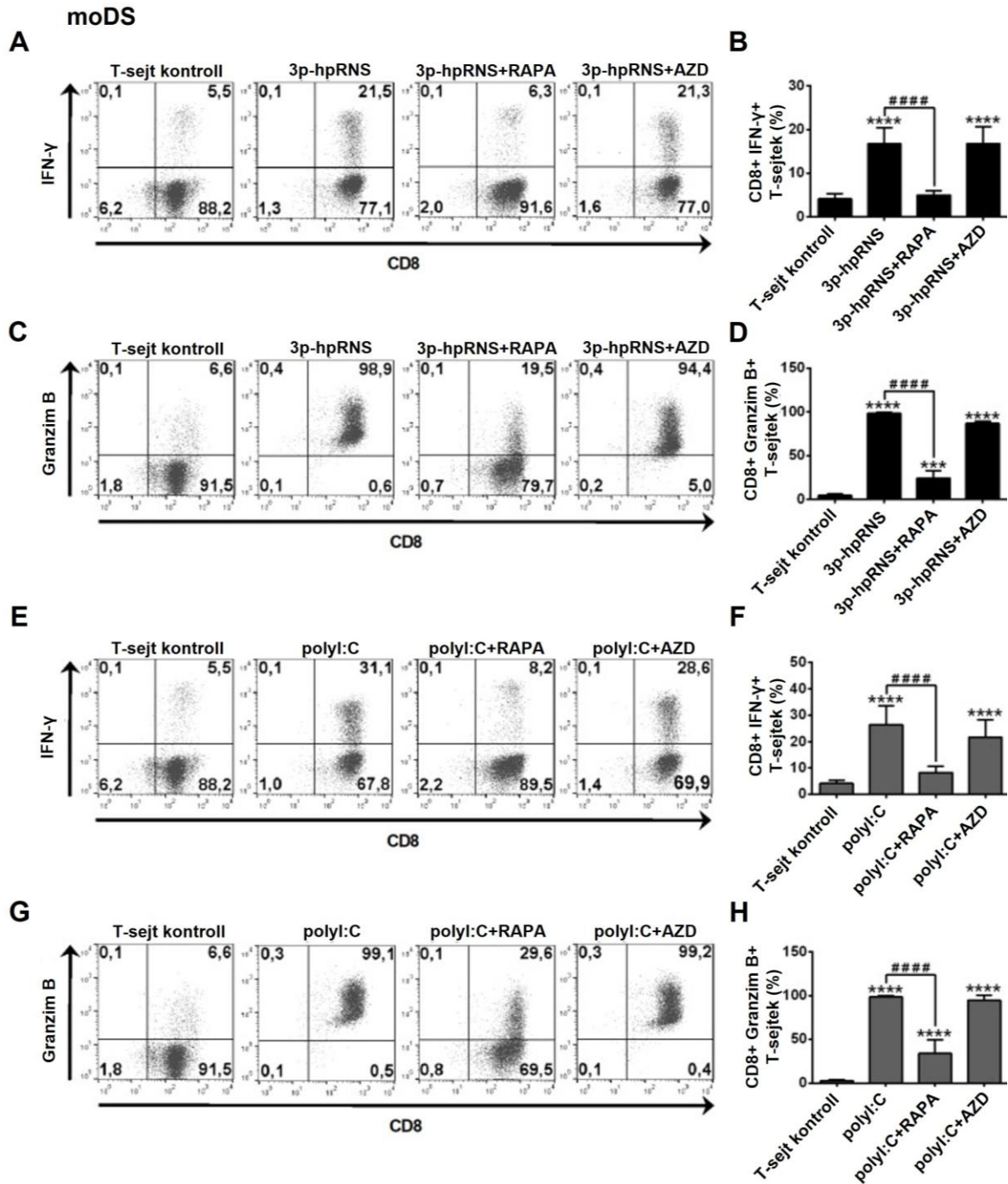
V.1.6 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek T-sejt aktiváló funkcióiban

Miután megállapítottuk, hogy az mTOR szabályozza az RLR-stimuláció által kiváltott citokin termelést a humán DS-ekben, kíváncsiak voltunk arra, hogy az mTOR gátlása hogyan befolyásolja a moDS-ek és a primer pDS-ek naiv CD8⁺ T-sejt aktiváló képességét. Így CFSE-vel jelölt allogén naiv CD8⁺ T-sejteket ko-kultiváltunk előzetesen RLR aktivált és mTOR gátolt moDS-ekkel (**26. A-D ábra**) és primer pDS-ekkel (**26. E-H ábra**), majd áramlási citometriával mértük a CD8⁺ T-sejtek proliferációját. Ezekben a kísérletekben a DS-eket élő vírus helyett szintetikus ligandumokkal stimuláltuk, mivel nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy a T-sejtek VSV-vel fertőződjenek meg a ko-kultiváció során, ami befolyásolhatná kísérleteink kimenetelét. Eredményeink azt mutatják, hogy a 3p-hpRNS-sel (**26. A,B ábra**) vagy polyI:C/LyoVecTM-vel (**26. C,D ábra**) kezelt moDS-ek, és 3p-hpRNS-sel (**26. E,F ábra**) vagy polyI:C/LyoVecTM-vel (**26. G,H ábra**) kezelt primer pDS-ek jelentős mértékben indukálják a CD8⁺ T-sejtek proliferációját. Azonban a T-sejtek proliferációja gátlódik, ha az RLR-stimuláció előtt rapamycinnel előkezeltük a moDS-eket (**26. A-D ábra**) és a primer pDS-eket (**26. E-H ábra**). Az AZD8055 kettős mTOR inhibitor ugyanakkor sokkal gyengébbnek bizonyult és a rapamycinhez képest jóval kisebb mértékben tudta csak gátolni a moDS-ek T-sejtek proliferációt indukáló hatását (**26. A-D ábra**). A primer pDS-ek esetében pedig az AZD8055 nem befolyásolta szignifikánsan az RLR aktiváció által stimulált sejtek naiv T-sejt proliferációt indukáló képességét (**26. E-H ábra**).



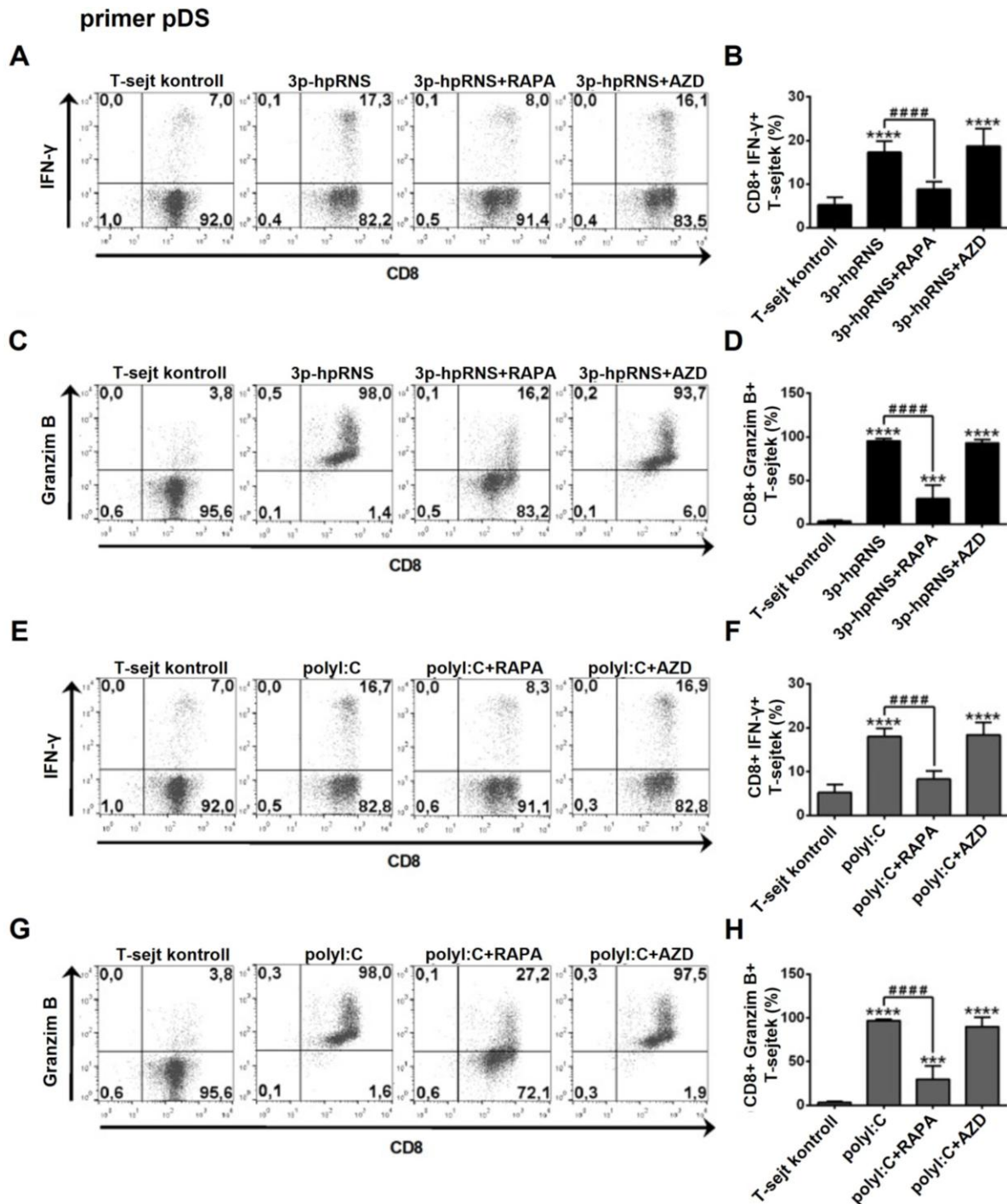
26. ábra. A rapamycin hatékonyan gátolja az RLR-stimulált moDS-ek és primer pDS-ek naiv T-sejt proliferációt indukáló hatását, szemben az AZD8055-tel. A CFSE-vel jelölt allogén, naiv CD8⁺ T-sejteket RLR-aktivált és mTOR gátolt moDS-ekkel (A–D) vagy primer pDS-ekkel (E–H) ko-kultiváltuk, majd 5 nap után a T-sejtek proliferációját áramlási citometriával mértük. (C,E,G) A reprezentatív hisztogramok az élő és osztódott T-sejtek százalékos arányát jelzik. (B,D,F,H) Az oszlopdiagramok legalább 6 független kísérlet átlagát $\pm$ SD-t ábrázolják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$. AZD: AZD8055; RAPA: rapamycin.

Párhuzamos kísérletek során az előzőekben leírt kísérleti rendszerben a kezelt DS-ek által aktivált CD8⁺ T-sejtek effektor funkcióit is elemeztük az IFN- γ citokin és a citotoxikus granzim B fehérje intracelluláris szintjének mérésével. Az allogén naiv CD8⁺ T-sejtek és kezelt moDS-ek 6 napos ko-kultivációját követően azt tapasztaltuk, hogy a 3p-hpRNS-sel **(27. A-D ábra)** vagy polyI:C/LyoVecTM-vel **(27. E-H ábra)** aktivált moDS-ek indukálták a CD8⁺ T-sejtek IFN- γ és granzim B termelését. Ha azonban a moDS-eket az RLR aktivációt megelőzően rapamycinnel kezeltük, a moDS-ek CD8⁺ T-sejteket aktiváló képessége jelentősen csökkent, amit viszont az AZD8055 előkezelés esetében nem tapasztaltunk **(27. A-H ábra)**.



27. ábra. A rapamycin az AZD8055-tel szemben csökkentette az RLR-aktivált moDS-ek T-sejt-aktiváló képességét. Az allogén, naiv CD8⁺ T-sejteket előkezelt moDS-ekkel ko-kultiváltuk, majd 6 nap után a T-sejteket forbol-mirisztát-acetáttal (0,1 µg/ml) és ionomicinnel (1 µg/ml) stimuláltuk protein transzport gátló (monenzin) jelenlétében 5 órán át. A CD8⁺ T-sejtek IFN-γ és Granzim B termelését intracelluláris citokin festést alkalmazva áramlási citometriával mértük. **(A,C,E,G)** Egy reprezentatív kísérlet adatai láthatók. A dot plot-okon lévő számok az egyes cellákban lévő T-sejtek százalékos arányát jelzik. **(B,D,F,H)** Az oszlopdiagramok 6 független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; #### $p < 0,0001$. AZD: AZD8055; RAPA: rapamycin.

Ezen kísérleteket megismételtük primer pDS-ekkel is és a moDS-ekhez nagyon hasonló eredményeket kaptunk. A primer pDS-ek is hasonló mértékben voltak képesek indukálni a naiv CD8⁺ T-sejtek IFN- γ és granzim B termelését, ha a pDS-eket előzetesen 3p-hpRNS-sel **(28. A-D ábra)** vagy polyI:C/LyoVecTM-vel **(28. E-H ábra)** aktiváltuk. A primer pDS-ek T-sejt aktiváló képessége is szignifikánsan csökkent rapamycin előkezelés mellett, míg az AZD8055 előkezelés nem befolyásolta ezen hatásukat **(28. A-H ábra)**. Ezen megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a humán DS-ek T-sejt aktiváló képessége főként szelektív mTORC1 gátlással befolyásolható, míg az mTORC1 és mTORC2 együttes gátlása valószínűleg elindíthat valamilyen kompenzáló mechanizmust, ami segítheti a DS-ek megfelelő antigén prezentálását és ezáltal T-sejt aktiváló képességét, de ezen feltételezés alátámasztása a jövőben további vizsgálatokat kíván.



28. ábra. Az RLR-stimulált primer pDS-ek T-sejt-aktiváló képességét a rapamycin csökkenti, szemben az AZD8055-tel. Az allogén, naiv CD8⁺ T-sejteket ko-kultiváltuk az előkezelt primer humán pDS-ekkel, majd 6 nap után a T-sejteket forbol-mirisztát-acetáttal (0,1 µg/ml) és ionomicinnel (1 µg/ml) stimuláltuk protein transzport gátló (monenzin) jelenlétében 5 órán át. A CD8⁺ T-sejtek IFN-γ és granzim B termelését intracelluláris citokin festést alkalmazva áramlási citometriával mértük. (A,C,E,G) Egy reprezentatív kísérlet adatai láthatók. Az egyes kvadránsokban lévő számok a sejtek százalékos arányát jelzik. (B,D,F,H) Az oszlopdiagramok 6 független kísérlet átlagát ± SD-t ábrázolják. ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. kontroll; ####p < 0,0001. AZD: AZD8055; RAPA: rapamycin.

V.2 Exogén immunmoduláció: A sugárzással méregtelenített LPS immunmoduláló hatásának vizsgálata humán moDS-eken

V.2.1 A natív és sugárdetoxifikált endotoxin humán moDS-ek életképességére és fenotípusosérésére gyakorolt hatásainak vizsgálata

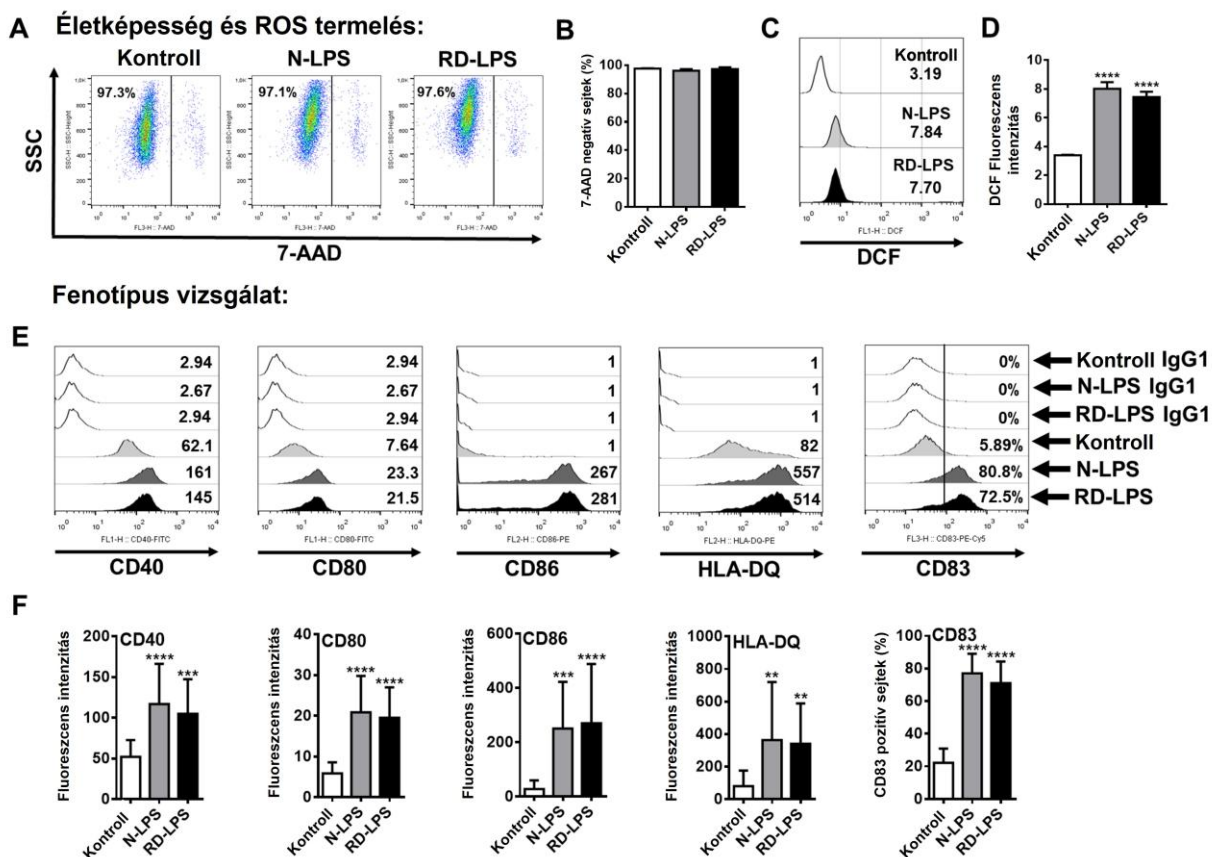
A bakteriális eredetű endotoxinok mindenütt jelen vannak a környezetben, és külső, exogén faktorként közvetlenül befolyásolhatják az immunválaszok kimenetelét, valamint a különböző betegségekre való fogékonyságot [142]. Alábbi kísérletsorozatunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a szerkezetileg módosított endotoxin a natív formához képest milyen különbségeket mutat a humán moDS-ekre kifejtett immunmoduláló hatásaiban.

Először is az endotoxinok humán moDS-ek életképességére gyakorolt hatását vizsgáltuk, hogy kizárjuk az LPS toxikus hatása miatti életképesség csökkenést, mely a DS-ek funkcióit is befolyásolná. A moDS-eket külön-külön 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük 24 óráig, majd a sejtek életképességét 7-AAD festést alkalmazva áramlási citometriával mértük **(29. A,B ábra)**. Eredményeink az mutatták, hogy az endotoxin kezelések egyike sem befolyásolta a moDS-ek életképességét az alkalmazott dózisban **(29. A,B ábra)**, így további kísérleteink során is ezt a dózist alkalmaztuk.

Ezt követően megvizsgáltuk az N-LPS és az RD-LPS intracelluláris ROS-indukáló képességét redox-érzékeny fluoreszcens festékkel (H₂DCF-DA) **(29. C,D ábra)**, aminek a fluoreszcencia intenzitás változása korrelál az intracelluláris ROS mennyiségével a sejtekben. Az endogén módon generált ROS ugyanis alapvető a DS-ek antigén prezentáló funkciójához [201]. Eredményeink szerint a moDS-ek N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel történő kezelése a DCF fluoreszcencia szignifikáns növekedését eredményezte, viszont nem volt szignifikáns különbség a DCF fluoreszcencia intenzitásában az N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezelt sejtek között, ami a két különböző típusú LPS azonos intracelluláris ROS-indukáló kapacitását jelzi **(29. C,D ábra)**.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a gamma-sugárzás hogyan befolyásolta az LPS immunstimuláló hatását, ami indukálhatja az moDS-ek fenotípusos érését, amely szükséges a T-sejtekkel való kölcsönhatáshoz és a T-sejtek aktivációjának beindításához [177,202,203]. A moDS-ek fenotípusos változásainak vizsgálatához különböző sejtfelszíni fehérjék, köztük a CD83 érési marker, a HLA-DQ antigénprezentáló molekula és a CD40, CD80 és CD86 kostimuláló molekulák expressziós szintjeinek változásait mértük 24 órás endotoxin stimulációt követően áramlási citometriával **(29. E,F ábra)**. Eredményeink azt mutatják, hogy

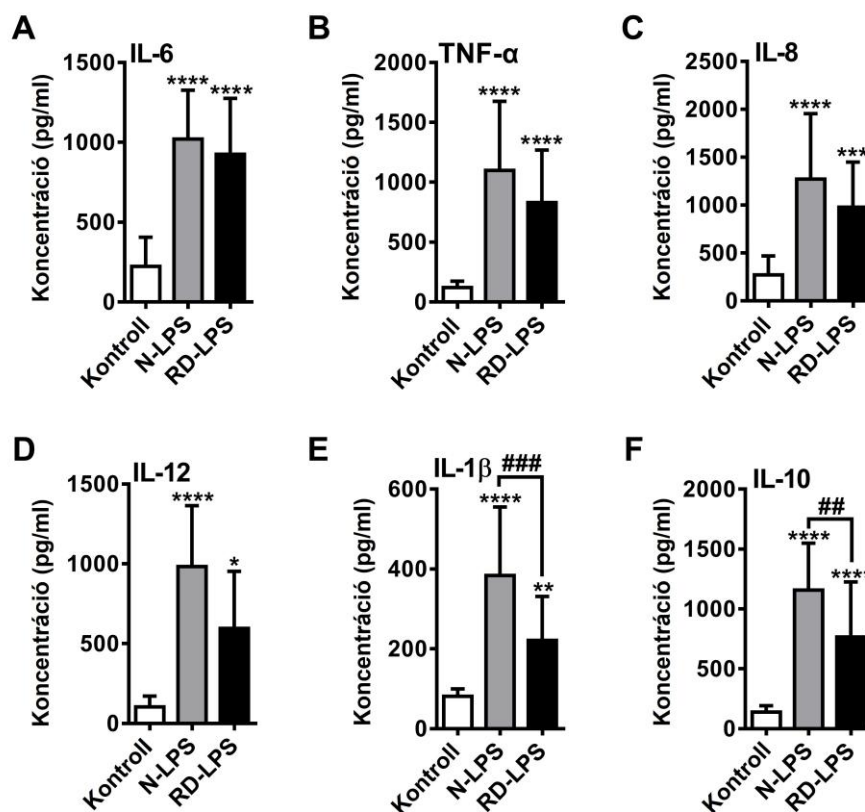
mind az N-LPS, mind az RD-LPS szignifikánsan növelte az összes vizsgált sejtfelszíni fehérje expresszióját a kezetlen sejtekhez képest. Azonban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két féle LPS moDS-aktiváló potenciálja között (**29. E,F ábra**). Összességében ezen eredményeink alapján megállapítható, hogy az N-LPS és az RD-LPS hasonló mértékben képes indukálni a humán moDS-ek érését.



29. ábra. Az RD-LPS-sel kezelt humán moDS-ek hasonló életképességet, intracelluláris ROS-termelést és fenotípusos változásokat mutatnak, mint az N-LPS-sel kezelték. (A–F) A moDS-eket 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük. (A,B) 24 óra elteltével a sejtek életképességét 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) festéssel mértük áramlási citometria segítségével. A reprezentatív pontdiagramok az (A) panelen láthatók, ahol a számok a 7-AAD negatív sejtek százalékos arányát jelzik. (C,D) Az intracelluláris ROS szint kimutatására 2',7'-dihidrodiklórflorescein-diacetáttal (H₂DCF-DA) töltött sejteket használtunk, amiket 2 órán keresztül kezeltük a kétféle endotoxinnal, majd áramlási citometriás analízist alkalmazva mértük a DCF fluoreszcencia intenzitásának változásait, ami korrelál a sejtekben képződött intracelluláris ROS koncentrációjával. A reprezentatív hisztogramokat a (C) panel mutatja, és a számok a DCF fluoreszcencia intenzitását jelzik. (E,F) A sejtfelszíni molekulák expressziós szintjének változásait 24 órás endotoxin stimulációt követően vizsgáltuk szintén áramlási citometriával. (E) Reprezentatív hisztogramok vannak megjelenítve, ahol a számok a fluoreszcencia intenzitásokat vagy a pozitív sejtek százalékos arányát jelzik. Az oszlopdiagramok 3 (B,D), illetve 18 (F) független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják. (B) ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll.

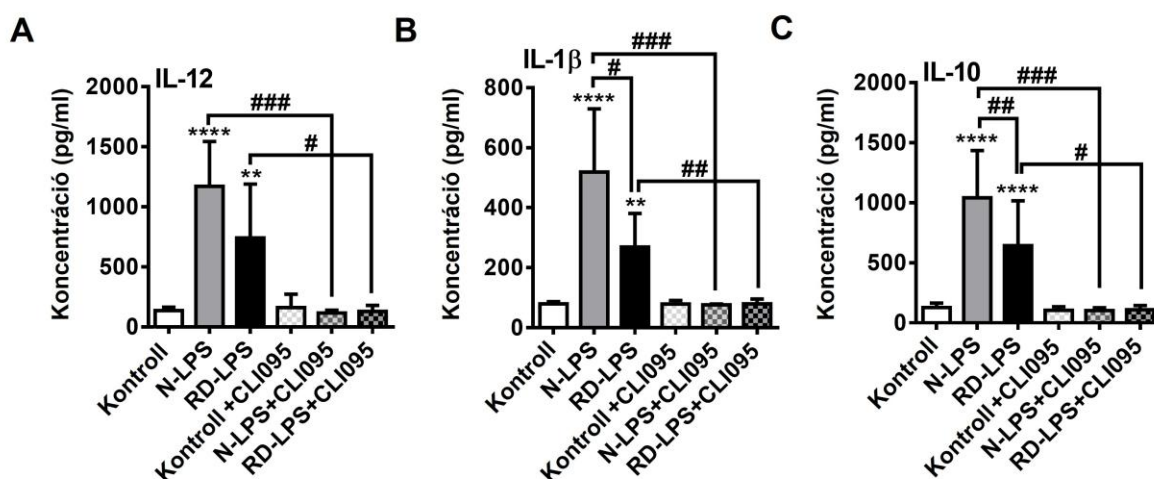
V.2.2 Az N-LPS és az RD-LPS hatásainak vizsgálata a humán moDS-ek citokin termelésére

Miután megállapítottuk, hogy az N-LPS és az RD-LPS hasonló módon indukálják a humán moDS-ek fenotípusos érését, a következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az LPS sugárzással történő méregtelenítése befolyásolja-e a moDS-ekre kifejtett citokin szekréciót indukáló képességét. Így a moDS-eket 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel stimuláltuk 24 órán keresztül, majd megvizsgáltuk az endotoxinnal kezelt humán moDS-ek citokin és kemokin szekréciós profiljában bekövetkező változásokat. A sejtkultúrák felülúszójából ELISA módszer segítségével mértük a sejtek által szekretált gyulladásos citokinek, úgymint az IL-6, TNF- α , IL-12 és IL-1 β , a gyulladáscsökkentő citokin IL-10 és IL-8 kemokin koncentrációit. Eredményeink szerint az LPS mindkét formája képes volt jelentősen növelni a moDS-ek összes mért citokin és kemokin szekrécióját (**30. A-F ábra**). Bár az RD-LPS-sel kezelt moDS-ek felülúszójában alacsonyabb citokin- és kemokin koncentrációkat mutattunk ki, mint az LPS natív formájával kezelt sejtek felülúszójában, szignifikáns különbségeket a besugárzott és a natív LPS hatásai közötti csak az IL-1 β (**30. E ábra**) és az IL-10 (**30. F ábra**) szintjében tudtunk detektálni.



30. ábra. Az N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezelt humán moDS-ek citokin és kemokin profilja (A–F) A humán moDS-eket két különböző típusú endotoxinnal kezeltük 24 órán keresztül. A kezelések után a szekretált fehérjék, azaz az (A) IL-6, (B) TNF- α , (C) IL-8, (D) IL-12, (E) IL-1 β és (F) IL-10 koncentrációját a sejtkultúrák felülúszójából ELISA módszer segítségével határoztuk meg. Az adatok 8 (A,B,C), illetve 17 (D,E,F) független kísérlet átlagát $\pm$ SD-jét ábrázolják. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. N-LPS.

Következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy az RD-LPS az N-LPS-hez hasonlóan a TLR4 útvonalon keresztül indukálja-e a moDS-ek citokin szekrécióját, vagy az LPS szerkezetének módosításával történt-e változás az LPS felismerésében. Így humán moDS-eket 1 μ M specifikus intracelluláris TLR4 antagonistával TAK 242-vel (CLI-095) [204] előkezeltük 1 órán keresztül, majd 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel stimuláltuk a sejteket 24 órán át. Az IL-12, IL-1 β , IL-10 szekretált citokinek szintjét ELISA-val detektáltuk a sejtek felülúszóiból. Megállapítottuk, hogy az RD-LPS által indukált fehérjeszekréció az N-LPS-hez hasonlóan TLR4-függő a moDS-ekben, mivel a vizsgált citokinek koncentrációja specifikus TLR4 gátlás mellett mind az N-LPS-sel, mind az RD-LPS-sel történő stimulálást követően a kontroll minták szintjén maradt (31. A–C ábra). Ezen eredményeink arra utalnak, hogy az endotoxin sugárzással méregtelenített formáját is képesek a moDS-ek TLR4-en keresztül felismerni, így az RD-LPS megtartotta a TLR4-hez való kötődési képességét.

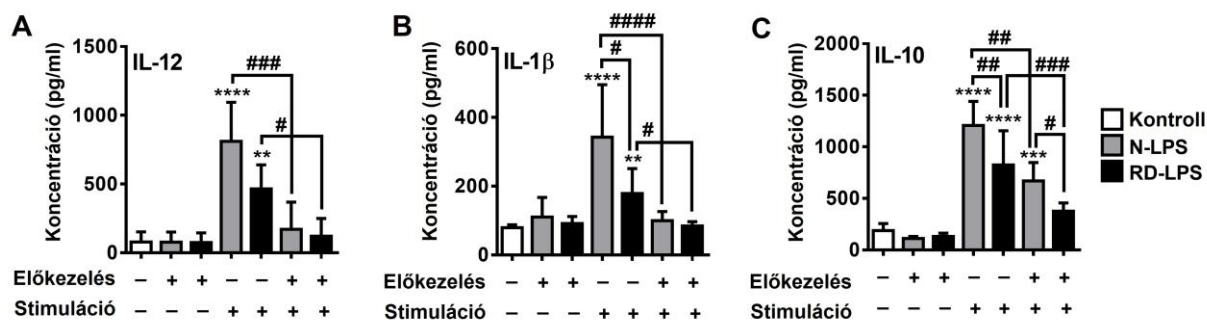


31. ábra. Mind az N-LPS-sel, mind az RD-LPS-sel kezelt moDS-ek citokin szekréciójára gyakorolt hatása gátlódik specifikus TLR4 inhibitor jelenlétében. A humán moDS-eket 1 μ M specifikus TLR4 inhibitorral (CLI-095) kezeltük 1 órán keresztül, majd 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel stimuláltuk 24 órán át. A szekretált citokinek, azaz az (A) IL-12, (B) IL-1 β és (C) IL-10 szintjeit ELISA-val detektáltuk a sejt kultúrák felülúszóiból. Az adatok 4 független kísérlet átlagát $\pm$ SD-jét ábrázolják. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. N-LPS vagy RD-LPS.

V.2.3 Az N-LPS és az RD-LPS endotoxin toleranciát indukáló képességének vizsgálata humán moDS-ekben

Az endotoxin tolerancia vagy LPS tolerancia olyan védelmi mechanizmus, amelyben az alacsony endotoxin koncentrációnak kitett sejtek olyan átmeneti állapotba kerülnek, ami csökkenti érzékenységüket egy második endotoxin dózissal szemben [205]. A következő kísérletsorozatban az N-LPS és az RD-LPS endotoxin toleranciát indukáló kapacitását szeretnénk volna megvizsgálni humán moDS-ekben. Így a DS differenciáció 4. napján a humán moDS-eket alacsony dózisú LPS-sel (5 ng/ml) előkezeltük, és a 6. napon újra nagy dózisú LPS-nek (250 ng/ml) tettük ki. Majd 24 órás kezelést követően ELISA-val meghatároztuk az IL-12, az IL-1 β és az IL-10 koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiból. Kísérletünkben az moDS-ek N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel történő restimulációja is az IL-12, IL-1 β és IL-10 citokinek szignifikánsan alacsonyabb koncentrációját eredményezte a sejtek felülúszóiban, az egyszeri nagy dózisú LPS kezeléshez képest (32. A-C ábra). Azonban nem volt szignifikáns különbség a felszabadult citokinek mennyiségében az N-LPS-reaktívált moDS-ek és az RD-LPS-reaktíváltak között, kivéve az IL-10 citokin esetében. Ugyanis mind az egyszeri nagy dózisú, mind az ismételt N-LPS kezelések szignifikánsan magasabb szintű IL-10 termelést

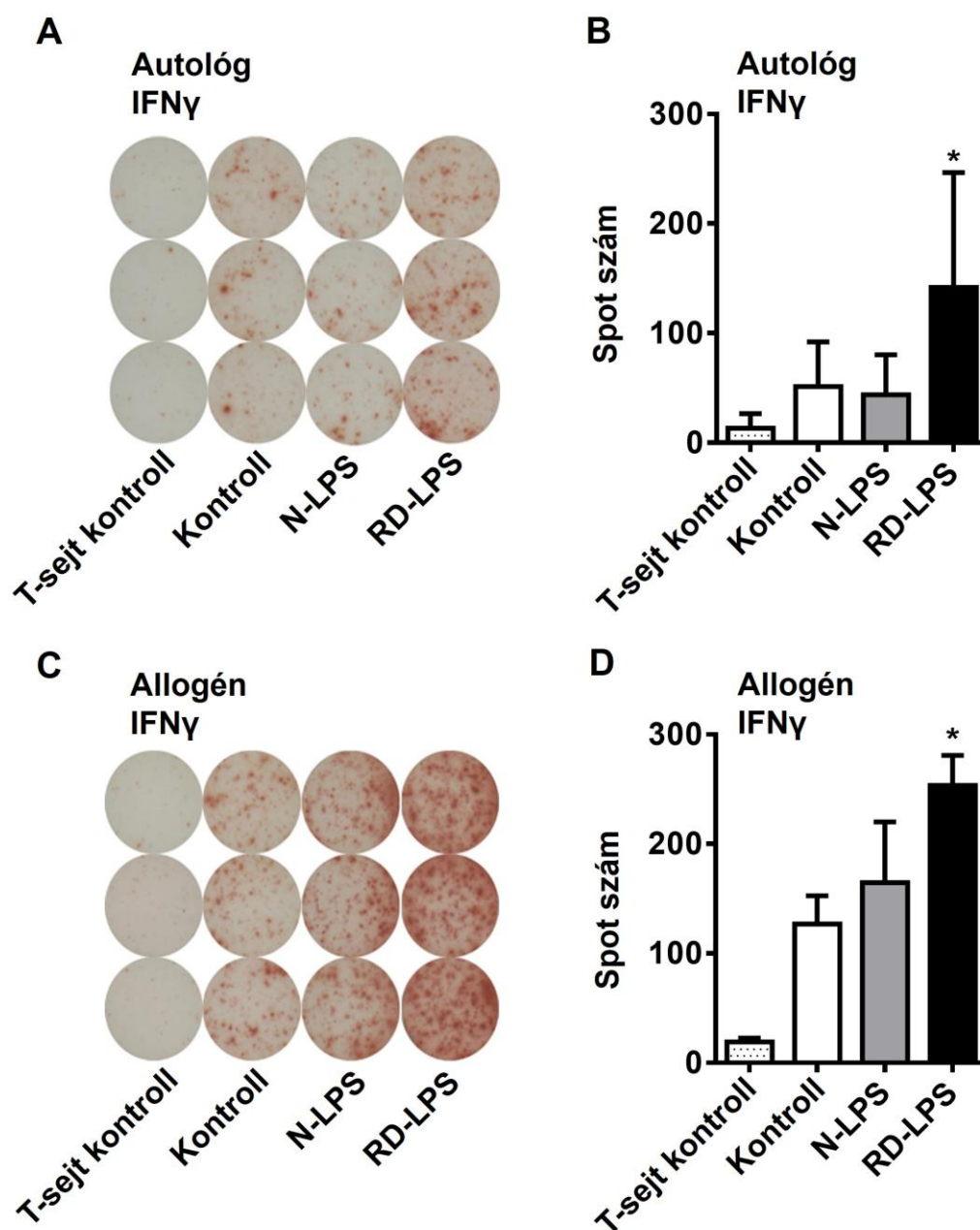
indukáltak, mint az RD-LPS-sel történő hasonló kezelések (32. C ábra). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az N-LPS és az RD-LPS is képes endotoxin toleranciát kiváltani a sejtekben, ugyanakkor mind az RD-LPS egyszeri dóziséval aktivált, mind az RD-LPS-sel restimulált moDS-ek alacsonyabb kapacitással rendelkeznek az IL-10 citokin előállítására, mint az endotoxin natív formájának kitett sejtek.



32. ábra. A humán endotoxin-tolerált moDS-ek citokin profilja. A humán moDS-eket 5 ng/ml natív LPS-nek (N-LPS) vagy sugárzással méregtelenített LPS-nek (RD-LPS) tettük ki a DS differenciálódás 4. napján, és 48 óra elteltével (a 6. napon) a sejteket 250 ng/ml endotoxinnal újra aktiváltuk 24 órán keresztül, hogy indukáljuk az endotoxin toleranciát a sejtekben. A kezelések után a sejtkultúrák felülúszójából ELISA-val megmértük a szekretált (A) IL-12, (B) IL-1β és (C) IL-10 citokinek szintjét. Az adatok 5 (A, B), illetve 14 (C) független kísérlet átlagát ± SD-jét ábrázolják. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ vs. N-LPS vagy RD-LPS.

V.2.4 Az N-LPS és az RD-LPS T-sejt aktiváló hatásainak vizsgálata humán moDS-ekben

Miután kimutattuk, hogy van különbség az N-LPS és RD-LPS moDS-ek citokin választás befolyásoló hatásaiban, kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e valamilyen eltérés az N-LPS-sel aktivált és az RD-LPS-sel aktivált humán moDS-ek T-sejt polarizációt kiváltó hatásai között. Így a humán moDS-eket 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük 24 órán át, majd a sejteket autológ (33. A,B ábra), és mind allogén (33. C,D ábra) CD3⁺ pan-T-sejtekkel ko-kultiváltuk 4 napig. Ko-kultivációt követően az IFN-γ-termelő T-sejtek arányát ELISPOT módszer segítségével határoztuk meg. Eredményeink szerint az RD-LPS-nek kitett humán moDS-ek sokkal erőteljesebben indukálják a Th1 irányú polarizációt, mint az LPS natív formájával aktivált sejtek mind autológ (33. A,B ábra), mind allogén (33. C,D ábra) rendszerben.

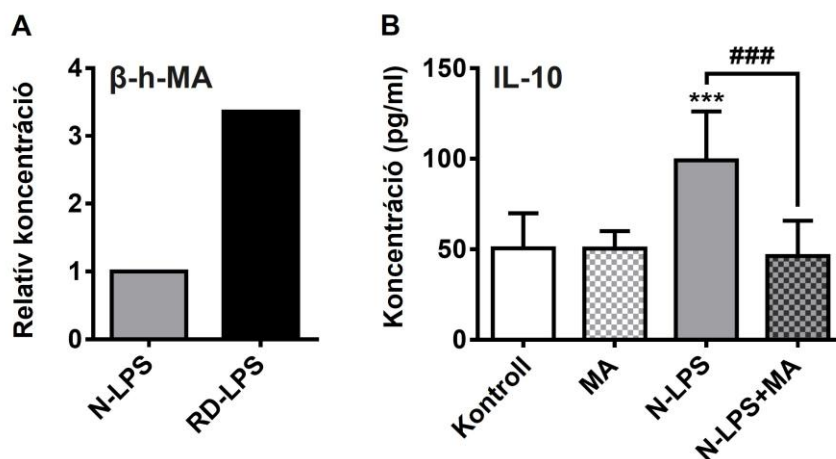


33. ábra. Az RD-LPS-sel kezelt moDS-ek nagyobb mértékben képesek kiváltani Th1 irányú polarizációt, mint az N-LPS-sel kezelt sejtek. A humán moDS-eket 250 ng/ml N-LPS-sel vagy RD-LPS kezeltük 24 órán keresztül, majd a sejteket autológ (A,B) vagy allogén (C,D) CD3⁺ pan-T-sejtekkel ko-kultiváltuk 4 napig. A ko-kultivációt követően az IFN- γ -termelő T-sejtek keletkezését humán IFN- γ -ra specifikus ELISPOT kit segítségével határoztuk meg. (A,C) Egy reprezentatív ELISPOT ábra látható, ahol a minták három párhuzamosban szerepelnek és ahol a spot-ok az IFN- γ -termelő T-sejteket jelzik. Az adatok 4 (B), illetve 8 (D) független kísérlet átlagát $\pm$ SD-jét mutatják be. * $p < 0,05$ vs. kontroll

V.2.5 Az RD-LPS mirisztinsav tartalmával összefüggő immunmoduláló hatások vizsgálata

Mivel eredményeink azt mutatták, hogy az N-LPS és az RD-LPS ugyanolyan mértékben képes indukálni a moDS-ek fenotípusos érését, az RD-LPS aktivált moDS-ek erősebb Th1 irányú polarizációt kiváltó kapacitása nem magyarázható az endotoxinok DS érésére gyakorolt eltérő hatásával. Ugyanakkor az IL-10 indukáló képessége a kétféle endotoxinnak eltérő volt, így a további kísérleteinkben megpróbáltuk feltárni ezen megfigyelésünk molekuláris hátterét. Feltételeztük, hogy a két endotoxin készítmény eltérő immunstimuláló képessége abból adódhat, hogy az RD-LPS esetében az ionizáló sugárzás következtében az endotoxin szerkezete megbomlik és különböző szabad zsírsavak szabadulnak fel, melyek immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Korábban megállapították, hogy a 150kGy erősségű ⁶⁰Co γ -sugárzás lebontotta az LPS szerkezetében található egyszerű cukrokat és így csökkentette a poliszacharid rész antigenitását. Az endotoxin lipid-A zsírsavai közül pedig a β -hidroximirisztinsav részlegesen átalakult mirisztinsavvá, vagy szelektíven lebomlott [176,178]. Így megvizsgáltuk LPS készítményeinkben a szabad zsírsavak, a β -hidroximirisztinsav koncentrációját nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás tömegspektrometriával (HPLC-MS) és azt találtuk, hogy a β -hidroximirisztinsav koncentráció háromszor magasabb volt az RD-LPS-ben (1,82 μ g/ml 1 mg/ml LPS-ben), mint az N-LPS-ben (0,53 μ g/ml 1 mg/ml LPS-ben) (**34. A ábra**).

Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy az RD-LPS-ben található szabad mirisztinsav származék magasabb koncentrációja befolyásolhatja az RD-LPS-nek kitett moDS-ek IL-10-indukáló potenciálját, ami alacsonyabb IL-10 termeléshez vezethet. Ezen hipotézisünk tesztelésére megvizsgáltuk az alacsonyabb mirisztinsav tartalommal rendelkező natív endotoxin IL-10 indukáló kapacitását mirisztinsav jelenlétében. Így a humán moDS-eket 250 ng/ml N-LPS-sel kezeltük mirisztinsav jelenlétében vagy anélkül és 24 óra elteltével mértük a szekretált IL-10 citokin szintjét a sejtkultúrák felülszójából ELISA módszerrel. Eredményeink szerint a mirisztinsavas kezelés önmagában nem változtatta meg az IL-10 alap szekréciós szintjét a moDS-ekben, de teljesen gátolta a sejtek N-LPS által indukált IL-10 szekrécióját (**34. B ábra**). Így az RD-LPS készítményben lévő magasabb mirisztinsav szint felelős lehet az RD-LPS-sel kezelt moDS-ek csökkent IL-10 termeléséért, és valószínűleg az alacsonyabb IL-10 szint mellett a Th1 felé történő polarizáció kifejezettebb lehet.



34. ábra. A mirisztinsav befolyásolja a humán moDS-ek endotoxin által indukált IL-10 termelését. (A) Az N-LPS és az RD-LPS készítmények β -hidroximirisztinsav (β -h-MA) tartalmát nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás tömegspektrometriával (HPLC-MS) határoztuk meg. Az oszlopdiaagram a β -hidroximirisztinsav relatív koncentrációját jelzi (2mg/ml LPS-ekben). (B) A humán moDS-eket 250 ng/ml natív LPS-sel (N-LPS) kezeltük mirisztinsav (MA) jelenlétében vagy hiányában és 24 óra elteltével meghatároztuk a szekretált IL-10 szintjét a sejt kultúrák felülszójából ELISA módszerrel. Az adatok 8 független kísérlet átlagát $\pm$ SD-jét mutatják. *** $p < 0,001$ vs. kontroll, ### $p < 0,001$ vs. N-LPS.

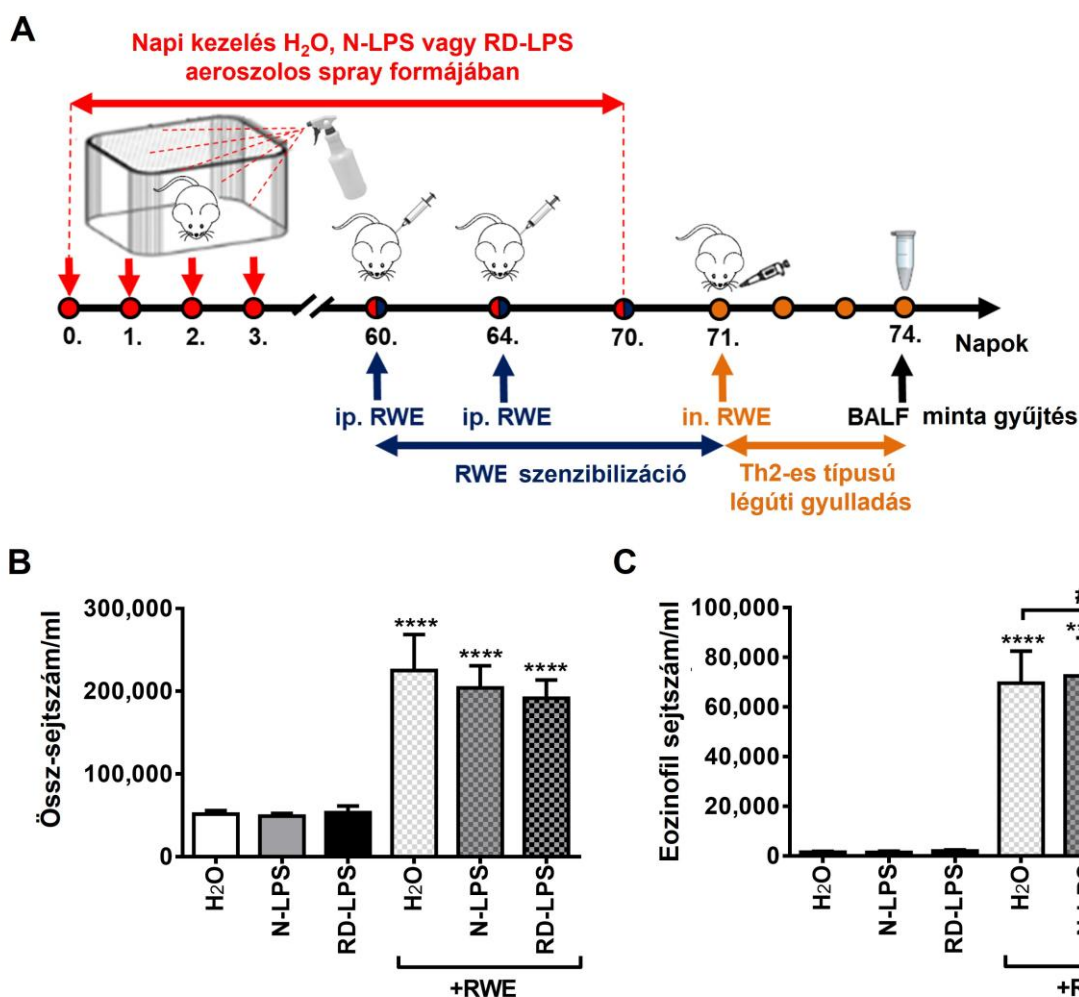
V.2.6 Az RD-LPS immunmoduláló hatásának vizsgálata a pollen által kiváltott légúti allergiás gyulladás egérmodelljében

Korábbi irodalmi adatok szerint a légutakban lévő mieloid DS-ek kulcsszerepet játszanak a belélegzett antigénekkal szembeni szenzitizációban és a Th2-függő légúti eozinofília kialakításában [206]. Mivel eredményeink azt mutatták, hogy az RD-LPS-sel kezelt humán moDS-ek erősebb Th1 polarizációt képesek kiváltani, mint az N-LPS-sel kezelt humán moDS-ek, ezért feltételeztük, hogy az RD-LPS T-sejt polarizációt befolyásoló hatása a Th2 gyulladásal asszociált allergiás reakciók esetében képes lehet csökkenteni a Th2 gyulladás tüneteit. Így megvizsgáltuk az RD-LPS immunmoduláló hatását *in vivo* pollen által kiváltott légúti allergiás gyulladás egérmodelljében is.

Egér kísérleteinkben elsőként megvizsgáltuk az endotoxin készítmények toxicitását és megállapítottuk, hogy az RD-LPS szemben az N-LPS-sel nem toxikus az egerekre, mivel 30 mg/kg dózisban az egereknek (4–10 csoport, csoportonként 8 egér) beadott RD-LPS hatására 48 óra elteltével egyetlen állat sem pusztult el. Ezzel szemben az N-LPS expozíció nyolc egér közül kettő halálát eredményezte azonos dózis és kezelési idő mellett. Továbbá a korábbi

limulus amoebocytá lizátum (LAL) vizsgálat eredményei is azt mutatták, hogy az RD-LPS limulus reaktivitása elenyésző volt az N-LPS-hez képest (limulus reaktivitás: RD-LPS/N-LPS=1/1000).

Miután megállapítottuk, hogy az RD-LPS a vizsgált dózisban nem toxikus az egerekre, megvizsgáltuk *in vivo* immunmoduláló hatását az allergiás légúti gyulladás egérmódeljét használva. A hethetes nőstény BALB/c egerek ketreceit 70 napon keresztül naponta kezeltük 5 µg N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel és kontrollként endotoxin-mentes vízzel (H₂O) aeroszolos spray formájában. A 70 napos kezelés alatt kétszer, intraperitoneálisan beadott, endotoxin-mentes parlagfű pollen kivonattal (RWE) szenzitizáltuk az egereket. Az LPS-kezelések befejezését követően a Th2 mediált allergiás gyulladást 100 µg RWE intranazális adásával váltottuk ki. Majd 72 óra elteltével az egereket termináltuk és vizsgáltuk a bronchoalveoláris mosófolyadékából (BALF) származó gyulladásos sejtek számát. Az egérvizsgálatok kezelési protokollját sematikus formában a **35. A ábrán** szemléltetjük. Azon egerek esetében, ahol az egerek környezetét kontrollként endotoxin-mentes H₂O-val kezeltük, majd RWE expozícióval kiváltottuk a Th2 allergiás gyulladást, az össz-sejtszám (**35. B ábra**) és az eozinofil sejtszám is (**35. C ábra**) jelentős növekedést mutatott az állatok BALF mintáiban. Ha az egerek környezetét az N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük 70 napig, majd ezt követően váltottuk ki bennük az allergiás gyulladást, a BALF minták sejtszámának enyhe csökkenését detektáltuk, azonban ezen változások statisztikailag nem voltak szignifikánsak (**35. B ábra**). Viszont az N-LPS-sel ellentétben az RD-LPS-ben gazdag környezet mellett szignifikáns csökkenést detektáltunk az allergizált egerek eozinofil számában (**35. C ábra**), mely sejtek az allergiás reakciók fő gyulladásos komponensei, és számuk a legjobban korrelál a tüdő funkciókkal és a Th2-típusú légúti gyulladás mértékével [207]. Így ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a környezet gazdagítása a nem toxikus RD-LPS-sel védelmet biztosíthat a parlagfű pollen által kiváltott légúti allergia ellen.



35. ábra. A sugárdetoxifikált LPS csökkentette a parlagfű pollen által kiváltott Th2-típusú légúti gyulladást egerekben. A hathetes nőstény BALB/c egerek ketrezeit (takarmány és alom) 70 napon keresztül naponta kezeltük 5 µg N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel és kontrollként endotoxin mentes vízzel (H₂O) aeroszolos spray formájában. A Th2-típusú légúti gyulladást endotoxin mentes parlagfű pollenkoncentrációval (RWE) történő intraperitoneálisan szenzibilizáció és ezt követően intranazális kezelés révén indukáltuk az egerekben. Az egerek terminálása után a bronchoalveoláris mosófolyadékot (BALF) összegyűjtöttük, és elemeztük a gyulladásos sejtek számát. **(A)** A kísérleti protokoll sematikus ábrázolása látható. **(B)** Az össz-sejtszámot, beleértve az eozinofil, neutrofil, limfocita, makrofág és **(C)** az eozinofil sejtek számát, külön-külön is meghatároztuk Wright–Giemsa-festést alkalmazva fénymikroszkóppal. A differenciál sejtszám meghatározásához legalább 400 sejtet számoltunk meg. Az adatok 10 független kísérlet átlagát ±SD-jét mutatják. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. RWE nélkül, ## $p < 0,01$ vs. H₂O + RWE.

VI. Megbeszélés

VI.1 DS funkciók endogén szabályozása: Az mTOR szerepe a humán DS-ek RLR-által közvetített vírusellenes válaszaiban

A DS-ek, mint a veleszületett immunitás sejtjei alapvető szerepet játszanak a különböző fertőzések korai felismerésében és a hatékony immunválasz elindításában, ugyanis számos PRR-t expresszálnak, melyekkel a mikrobiális struktúrákat, a PAMP-okat képesek detektálni [208]. A citoplazmában a virális eredetű nukleinsavak felismerésére az RLR-ek specializálódtak, melyek az aktívan replikálódó vírusok elleni immunválaszokat közvetítik [192]. Felismerést követően a RIG-I vagy az MDA5 olyan jelátviteli kaszkádot indít el, ami I-es típusú IFN-ok és gyulladást csökkentő citokinek termeléséhez vezet és hatékonyan segíti a vírusok gazdaszervezetből történő eliminálását [64].

Az elmúlt évtizedben számos tanulmányban az mTOR komplexet a TLR-mediált DS funkciók központi, endogén szabályozójaként azonosították, viszont az mTOR szerepét a humán DS-ek RLR-függő antivirális válaszában még nem vizsgálták [84-86,88].

A PI3K/mTOR által közvetített endogén szabályozó mechanizmusok a DS-ek aktiválódását, túlélését, érését, citokin termelését és T-sejt-stimuláló képességét is befolyásolják [84]. Továbbá számos vírus aktiválja a PI3K/Akt/mTOR jelátvitelt a fertőzött sejtekben, hogy elősegítse a sejtek túlélését és gátolja az apoptózist [209-210]. Például kimutatták, hogy humán tüdő hámsejtek *Sendai vírussal* történő fertőzése számos mTOR szubsztrát foszforilációját indukálja, ami megnövekedett mTOR aktivitásra utal. A *Sendai vírus* felismerése elsősorban a RIG-I-en keresztül történik, az MDA5 és a TLR7 mellett [211]. Korábbi tanulmányok azt is megerősítették, hogy az mTORC1 kulcsfontosságú tényező a koronavírusok replikációjának szabályozásában, amelyek replikációs köztitermékeit szintén az RLR-ek ismerik fel [192,212].

Ezen korábbi megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az RLR-ek által közvetített immunválaszok is mTOR szabályozás alatt állhatnak, amit saját kísérletes munkánk eredményeivel közvetlenül is igazoltunk. Kimutattuk ugyanis, hogy hasonlóan a TLR jelátvitel aktiválásához, a humán DS-ek specifikus RLR-stimulálása is kiváltja az mTOR jelátviteli útvonal aktiválódását. Megállapítottuk, hogy a moDS-ek és a pDS-ek aktiválása RIG-I/MDA5 specifikus ligandumokkal szignifikánsan fokozta a p70S6K és az Akt foszforilációt, ami a megnövekedett mTORC1 és mTORC2 aktivitást tükrözi. Korábbi

tanulmányokban leírták, hogy az mTOR útvonal központi szerepet játszik a DS-ek aktivációt követő metabolikus változásainak koordinálásában is és segíti a glikolitikus átprogramozást [97,31]. Mivel munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a pDS-ekkel szemben a moDS-ek RIG-I általi aktivációja glikolízis függő folyamat, teszteltük azt is, hogy az mTOR gátlás hogyan befolyásolja a moDS-ek RLR által vezérelt glikolitikus váltását [190]. A rapamycin és az AZD8055 egyaránt jelentősen csökkentette a glikolízis végtermékének, a laktátnak a termelődését és a glikolízissel kapcsolatos gének kifejeződését az RLR stimulált moDS-ekben, ami tükrözi az mTOR gátlás hatására bekövetkező csökkent glikolitikus aktivitást.

Az irodalomban számos, sokszor ellentmondásos eredmény található arról, hogy az mTOR pozitív vagy negatív szabályozó szerepet játszik-e a DS-ek különböző altípusainak TLR által mediált fenotípusos éréseben és citokin termelésében. A pDS-ekben és az Flt3L függő DS-ekben például kimutatták, hogy az mTOR-nak vagy a p70S6K-nak a gátlása akadályozza a TLR9 által közvetített I-es típusú IFN termelést [85,86]. A moDS-ekben az mTOR rövid távú blokkolása a gyulladásos citokinek (IL-6 és TNF) csökkent termeléséhez vezetett a különféle sejtfelszíni TLR-ekkel történő stimulálást követően. Ezzel ellentétben, a CD1c⁺ cDS-ek rapamycin előkezelése növelte a TLR4 által indukált IL-6 termelést, ugyanakkor nem befolyásolta a TNF szekrécióját [77]. Korábbi eredmények szintén alátámasztották, hogy az mTOR elengedhetetlen az I-es és III-as típusú IFN-ok termeléséhez mind moDS-ekben, mind CD1c⁺ cDS-ekben endoszomális TLR3 stimulációt követően [88]. Továbbá érdekességképpen a rapamycin előkezelés csökkentette az IFN- α polyI:C-indukálta szekrécióját olyan eger makrofágokban is, amelyekből hiányzik a TLR3 adapter molekulája, a TRIF, ami felveti annak a lehetőségét, hogy az mTOR az RLR által indukált citokin termelést is befolyásolhatja, mivel a polyI:C TLR3 szignalizáció hiányában RLR aktiváció révén indukálhat I-es típusú IFN szekréciót a sejtekben [85].

Saját vizsgálataink eredményei egyértelműen bizonyítják, hogy az mTOR az RLR-közvetített citokin válaszok alapvető pozitív szabályozójaként funkcionálhat a humán DS-ekben, mivel a rapamycin és az AZD8055 egyaránt jelentősen csökkentette mind a moDS-ek, mind a pDS-ek RLR által közvetített IFN- α , IL-6 és TNF citokin szekrécióját. Továbbá a DS-ek élő, replikálódó VSV-vel történő fertőzésekor, mely főként RIG-I aktivációval asszociál az mTOR inhibitorok jelenléte szintén a sejtek citokin termelésének csökkenését eredményezte [213]. Eredményeink összhangban vannak azokkal a korábbi tanulmányokkal, melyek

beszámoltak arról, hogy az mTOR gátlás csökkenti a VSV által kiváltott IFN- α termelést Flt3L-függő DS-ekben [85].

Továbbá, mivel mindkét mTOR inhibitor jelenlétében csökkent TBK1 foszforilációt detektáltunk az RLR aktiválást követően, azt feltételezzük, hogy az mTOR a TBK1 foszforilációval szabályozza a humán DS-ek-ben a RLR indukált citokin termelést. Ellentétben a citokin válaszokkal, az mTOR gátlásakor nem tudtunk kimutatni szignifikáns változásokat az RLR-stimulált DS-ek fenotípusában, kivéve a pDS-ek CD83 expressziójában, amit az AZD8055 előkezelés tovább fokozott az RLR-stimulált sejtekben. Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy rapamycin előkezelés mellett a CD83 szint emelkedett a TLR-aktivált CD1c⁺ cDS-ekben, de nem moDS-ekben [88]. Mindezen adatok arra utalnak, hogy az mTOR DS-ek fenotípusát befolyásoló hatásai nagymértékben függenek a sejttypustól, az aktivációs módtól és a stimulált receptor típusától is. Számos adat van arra nézve, hogy az mTOR részt vesz a DS-ek általi antigén bemutatás szabályozásában is és ezáltal képes befolyásolni a DS-ek effektor T-sejt aktiváló kapacitását [84].

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy az mTORC1 gátlószere, a rapamycin hatékonyan csökkenti az RLR-stimulált moDS-ek és pDS-ek CD8⁺ T-sejtek proliferációt indukáló képességét. Azonban érdekes módon az AZD8055 kettős mTORC1/mTORC2 kináz inhibitor csak kis mértékben volt képes csökkenteni az RLR-stimulált moDS-ek T-sejt-proliferációt kiváltó képességét, miközben a pDS-ekét nem befolyásolta. Megfigyelésünk összhangban van egy másik tanulmánnyal, mely kimutatta, hogy a rapamycin hatékonyabb gátlója az egér csontvelői DS-ek által indukált CD8⁺ T-sejt proliferációnak, mint az AZD2014 kettős mTOR inhibitor, amelyet a rapamycinnél 20-szor nagyobb dózisban kell alkalmazni a hasonló gátló hatás elérése érdekében [93]. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy az mTOR inhibitorok magasabb dózisban toxikusak a sejtekre, megfigyeléseink szerint is az AZD8055 100 nM-nél nagyobb dózisban jelentősen csökkenti az moDS-ek túlélését (ezen adatokat nem közöltük) [214]. Hasonlóképpen, a Torin-1, egy másik ATP-kompetitív mTOR inhibitor a rapamycinnel szemben kevésbé volt hatékony a TLR4-stimulált egér csontvelői DS-ek T-sejt stimuláló képességének csökkentésében [215].

Megállapítottuk továbbá, hogy a T-sejt poliferáció mellett, az AZD8055 az RLR-aktivált DS-ek CD8⁺ T-sejtek citokin termelését indukáló képességét sem befolyásolta, szemben a rapamycinnel, ami szignifikánsan csökkentette azt. Ez a jelenség egy mTORC2 által mediált negatív visszacsatolási hurok elvesztésével magyarázható, amelyet a kettős mTOR inhibitorok

elnyomnak. Ugyanis nemrégiben kimutatták, hogy az NPV-BEZ235 kettős PI3K/mTOR inhibitor túlaktiválja a mitogén-aktivált protein-kináz kináz (MEK)/extracelluláris szignál által szabályozott kináz (ERK) utat humán hasnyálmirigysejtekben [216]. A DS-ek PRR-ek útján történő stimulálása is különböző MAPK-ok aktiválódásához vezet, amik közül a MEK/ERK jelátviteli út az antigén prezentáció pozitív szabályozójaként működik a moDS-ekben. Érdekes módon úgy tűnik, hogy az mTORC2 blokkolása önmagában inkább fokozza, mint gátolja a DS-ek T-sejt stimuláló képességét. Például az mTORC2 hiánya a bőrben lévő DS-ekben fokozott CD8⁺ T-sejt effektor válaszokat és fokozott bőrgraft kilökődést váltott ki [217]. Ezenkívül egérmodellben kimutatták, hogy az mTORC2 hiányos mieloid DS-ek fokozott allostimulációs képességgel rendelkeznek és nagyobb mértékben képesek indukálni az IFN- γ és IL-17 termelő T-sejtek aktivációját TLR függő és TLR független stimulációt követően egyaránt [218]. Az mTORC2-hiányos DS-ek fokozott antigén prezentáló képességének mechanizmusát egyelőre még nem tárták fel, így további vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy az mTORC1 és kettős mTORC1/C2 inhibitorok hatásai közötti különbségeket megmagyarázzuk.

Kutatási eredményeink igazolták, hogy az endogén szabályozó rendszerek egyik nélkülözhetetlen eleme, az mTOR alapvető szerepet játszik a humán DS-ek RLR által közvetített antivirális válaszainak szabályozásában. Kimutattuk továbbá, hogy az mTORC1 szelektív inhibitora, a rapamycin nagymértékben csökkenti az RLR-stimulált DS-ek T-sejt stimuláló hatását, azonban a kettős mTORC1/mTORC2 inhibitornak nincs ilyen hatása. Így a transzplantációk utáni immunszuppressziós kezeléseknél általánosan használt rapamycin hatékonynak bizonyulhat a vírusfertőzések kezelésére is. Ezt támasztja alá azon megfigyelés is, miszerint a rapamycin és származéka, az everolimus csökkenti a látens vírusok reaktivációjából származó komplikációkat transzplantált betegek esetében [219]. A rapamycint továbbá tolerogén DS-ek előállítására is használják *ex vivo*, ami ígéretes terápiás lehetőséget kínál a transzplantációt követő kilökődések megelőzése mellett az allergiás, illetve autoimmun betegségek kezelésére is [220]. A kettős mTOR inhibitorokat is tesztelik klinikai vizsgálatokban a különböző tumoros elváltozások kezelése, a szervkilökődések megakadályozás és az autoimmun betegségek kezelése kapcsán [221]. Ugyanakkor eredményeink rámutatnak arra, hogy az első és a második generációs mTOR gátlóknak a különböző immunsejtek funkcionalitására gyakorolt eltérő hatásait is figyelembe kell venni az új generációs mTOR inhibitorok fejlesztése során.

VI.2 DS funkciók exogén szabályozása: sugárdetoxifikált LPS immunmoduláló hatásainak vizsgálata humán moDS-eken

A környezetünkben lévő exogén faktorok közül az endotoxinok immunmoduláló tulajdonságaik révén befolyásolhatják a humán DS-ek funkcióit, így a következőkben azt vizsgáltuk, hogy az endotoxin méregtelenített formája milyen hatással lehet a humán DS-ek által mediált immunológiai folyamatokra. A higiéniai hipotézis szerint a korai életkorban a környezeti mikrobákkal és endotoxinjaikkal történő expozíció a veleszületett immunválasz hatékony aktivátora lehet, és védelmet nyújthatnak az atópiás betegségek kialakulása ellen [222,223]. Azonban az endotoxinok immunmoduláló szerként való alkalmazását erősen korlátozza, hogy rendkívül mérgezőek, képesek klinikai tüneteket kiváltani, beleértve a sokkot, a lázat, a hidegrázást, a hörgőszűkületet és a nem specifikus bronchiális hiperreaktivitást [163,164]. Ugyanakkor állatokon és embereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az LPS 150 kGy erősségű, ⁶⁰Co gamma-sugárzással történő detoxifikálása megőrzi az endotoxin immunológiai adjuváns és immunmodulátor tulajdonságát és a detoxifikált forma védelmet nyújt az endotoxin sokk és a sugárzás okozta betegségek ellen, valamint stimulálja a természetes védekezőrendszert [184].

Az LPS molekulák a legtöbb Gram negatív baktériumban jelen vannak, a sejtmembrán külső felületének fő komponensei, a baktérium lizálása után szabadulnak fel és folyamatosan ürülnek a környezetbe, így bárhol megtalálhatók baktériumok jelenlétében, beleértve a port, a levegőt, a vizet, a talajt és a különböző táplálékokat [142]. A lipid-A az LPS konzervált molekuláris mintázata és az LPS expozíciókra adott immunológiai válaszok fő induktora. Szerkezetének és aktivitásának kapcsolatát alaposan tanulmányozták és a lipidláncok számát az LPS immunológiai aktivitását szabályozó legfontosabb tényezőként azonosították. A hat lipidláncsal rendelkező lipid-A (például *E. coli* LPS) optimális gyulladásos aktivitással rendelkezik, míg az öt lipidláncsal rendelkező lipid-A molekulák ~ 100-szor kevésbé aktívak, és a négy lipidláncsal rendelkezők teljesen nélkülözik aktivitásukat. Általában a különböző Gram negatív baktériumból származó LPS-ek lipid-A összetétele kisebb eltéréseket mutat és közvetlenül kötődik a TLR4-MD2 receptor komplexhez és elindítja a gyulladásos jelátviteli útvonalakat [156]. Miután a DS-ek professzionális APS-ekként alapvető szerepet játszanak a T-sejtek aktiválásában és a T-sejtek által közvetített adaptív immunválaszok polarizációjában [12], a DS-ek LPS expozíciója nagymértékben befolyásolhatja az immunválaszok kimenetelét.

Kísérleteink során először megvizsgáltuk a natív és a sugárdetoxifikált endotoxinok humán moDS-ek funkcionális aktivitására gyakorolt hatását. *In vitro* kísérleteink során olyan LPS dózist (250 ng/ml) alkalmaztunk, ami az N-LPS esetében sem toxikus még a DS-ekre, hogy kizárjuk az N-LPS toxikus hatása miatti károsodott DS funkciókat. Eredményeink azt mutatták, hogy az RD-LPS-nek kitett humán moDS-ek hasonló ROS képző képességgel bírnak, mint az RD-LPS-sel kezelt DS-ek és fenotípusos érésük is hasonló. Az endogén, intracelluláris ROS esszenciális mediátora a DS-ek általi antigénprezentációnak, a moDS-ek fenotípusos érése pedig szükséges a T-sejtekkel való kölcsönhatásokhoz [201,28,13].

További eredményeink szerint az LPS mindkét formája szignifikánsan növelte a moDS-ek citokin és kemokin szekrécióját, ugyanakkor az N-LPS-sel kezelt moDS-ekhez képest az RD-LPS-sel kezelt moDS-eket csökkent gyulladáshoz potenciál jellemzett. Az összes mért szekretált citokin koncentrációja az N-LPS-sel stimulált moDS-ekhez képest csökkenő tendenciát mutatott, viszont az RD-LPS csak a gyulladáskeltő IL-1 β és a gyulladáscsökkentő IL-10 esetében eredményezett szignifikánsan is alacsonyabb fehérjeszintet az N-LPS-hez képest. Az RD-LPS csökkent gyulladáskeltő hatása valószínűleg a detoxifikálásnak köszönhető. Korábbi vizsgálatok beszámoltak arról, hogy az ionizáló sugárzás módosítja az LPS szerkezetét és a poliszacharid részek lebomlását, valamint a lipid-A komponens megváltozását eredményezi. A sugárzás az RD-LPS készítményekben szignifikánsan csökkenti a glükózamin, a foszfát, a Kdo és a zsírsav komponenseket, ami a lipid-A szerkezet megváltozását jelzi a natív LPS készítményekhez képest [174,178,183]. Korábban publikálták, hogy a poliszacharid lánc hossza is magyarázhatja az LPS gyulladáshoz aktivitásának különbözőségét az eltérő fajokban, ugyanis például a *Salmonella Minnesotából* származó LPS, amelyet rövid poliszacharid lánc jellemez, gyengébb gyulladáskeltő (IL-6, TNF) és gyulladáscsökkentő (IL-10) citokin válaszokat generál, mint a hosszabb poliszacharid láncú LPS *in vivo* egér modellben, míg humán makrofágokban, az *E. coli* durva láncú LPS-e szignifikánsan nagyobb gyulladást vált ki, mint a sima láncú LPS-e [152,177].

Kísérleteinkkel igazoltuk azt is, hogy az N-LPS-hez hasonlóan az RD-LPS által indukált fehérjeszekréció is TLR4 jelátvitel függő a moDS-ekben. A TLR4 receptor CLI-095-tel történő gátlása után az N-LPS-hez hasonlóan az RD-LPS hatására is teljesen gátolt a sejtek citokin szekréciója. Ez arra enged következtetni, hogy az endotoxin sugárzással detoxifikált formája is képes volt reagálni a TLR4-gyel és megtartotta kötődési képességét és specifikusságát erre a receptorra. Ezen eredményünk összhangban van azokkal az irodalmi

adatokkal, amikor a sejteket CLI-095-tel, vagy más néven TAK-242-vel kezelték elő, ami a TLR4 jelátvitel specifikus gátlását eredményezve teljesen megszüntette az endotoxin által kiváltott IL-12, IL-1 β és IL-10 termelődését moDS-ekben [204].

Fontos megjegyezni, hogy kísérleti rendszerünkben mind az RD-LPS, mind az N-LPS képes volt endotoxin toleranciát indukálni, mivel mindkettő gátolta az IL-12 és az IL-1 β gyulladásokeltő citokinek termelését az ismételt LPS kezelések után. Az a tény, hogy a nem toxikus RD-LPS megőrizte az endotoxin tolerancia kiváltásának képességét, a méregtelenített LPS előnyös tulajdonságának tekinthető. Ugyanis korábban például leírták, hogy az endotoxin tolerancia kialakulása a szervezetben döntő tényező lehet az allergiás légúti gyulladások enyhítésében [224,225]. Az endotoxin-tolerált sejtek amellet, hogy másodlagos stimuláció esetén kevesebb gyulladásokeltő mediátort szekretálnak, magasabb gyulladásokcsökkentő citokin szinteket is eredményeznek, mint például magasabb IL-10 és transzformáló növekedési faktor béta (TGF- β) szinteket [226,227].

Rendszerünkben azonban sem a natív, sem a sugárzással méregtelenített LPS nem eredményezett megnövekedett IL-10 szintet az endotoxin-tolerált moDS-ekben az egyetlen LPS dózissal kezelt sejtekhez képest. A megfigyelt különbség valószínűleg az LPS molekulák heterogenitásának köszönhető, mivel az LPS fajtája és az, hogy milyen baktériumfajból származik nagymértékben befolyásolhatja az immunválasz minőségét [228].

Az ELISPOT méréseinkből származó adataink azt mutatták, hogy a humán moDS-ek RD-LPS-sel történő kezelése nagyobb potenciállal indukálja az IFN- γ -termelő Th1 sejtek polarizációját a ko-kultúrákban, mint az N-LPS. Mivel intracelluláris ROS termelésben és fenotípusos érésben nem volt különbség az N-LPS és RD-LPS hatásai között, valószínűsítjük, hogy az eltérő Th1 indukáló hatás mögött a citokin termelés indukálásában tapasztalt különbségek állhatnak. Ugyanis az N-LPS kezelés szignifikánsan magasabb IL-1 β és IL-10 citokin szinteket eredményezett az RD-LPS-hez képest. Korábban beszámoltak arról, hogy az IL-1 β szignifikánsan növeli a CD4⁺ T-sejtek túlélését, az antigén által vezérelt expansziót, a differenciálódást és az *in vivo* citokin termelést [202]. Ezenkívül azt is megfigyelték, hogy az IL-1 β hatással van a Th2 differenciálódásra, a CD4⁺ T-sejtek tenyésztése Th2 polarizáló körülmények és IL-1 β jelenlétében az IL-13 termelés jelentős növekedését eredményezték az IL-1 β nélkül tenyésztett sejtekhez képest. Így valószínűleg a DS-ekből származó IL-1 β kedvezhet a Th2 irányú polarizációnak, ami a Th1 irányt háttérbe szorítja. Az IL-10-et az immunválaszok globális szuppresszoraként és a Th sejtválaszok szabályozójaként ismerik

legfőképpen, mindazonáltal az IL-10 immunszabályozó funkciója ennél jóval összetettebbnek tűnik [229]. Az IL-10-et eredetileg a Th2 sejtek által termelt citokinnek írták le, mely rendelkezik azzal a képességgel, hogy a Th1 sejtek citokin termelését elnyomja. Később kiderült, hogy a monociták és a makrofágok, valamint a DS-ek is jelentős mennyiségű IL-10-et szekretálhatnak az LPS stimulusra adott válaszként [230,203].

Eredményeink azt sugallják, hogy az N-LPS IL-10 indukáló hatása a moDS-ekben kifejezettebb volt, mint az RD-LPS kezelések esetében, így az N-LPS-sel kezelt DS-ek alacsonyabb Th1 polarizáló kapacitása a magasabb IL-10 szint miatt alakulhatott ki. Ezenkívül kimutatták *in vitro* is, hogy az IL-10-et előállító DS-ek elősegítik a Th2 sejtek polarizációját, míg gátolják a Th1 válaszokat [231,232]. Továbbá az IL-10-et, IFN- γ -t korlátozó és a Th2 sejteket támogató citokinként említik többféle Th2 típusú gyulladásban is, különböző *in vivo* egérmodellekben [233,234]. Feltételeztük továbbá, hogy az RD-LPS-nek kitett moDS-ek IL-10 termelését befolyásolhatták az endotoxin ionizáló sugárzása által generált szabad zsírsavak is, mivel vizsgálataink szerint a β -hidroximirisztinsav koncentrációja háromszor magasabb volt az RD-LPS készítményekben, mint az N-LPS-ben. Széles körben elfogadott, hogy a szabad zsírsavak immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkeznek, és befolyásolják az immunválaszok kimenetelét a szervezetben [235]. A mirisztinsavról korábban megállapították, hogy gombaellenes, és gyulladáscsökkentő hatása van, ezenkívül a mirisztinsav szabályozza az autofágiát és az I-es típusú IFN válaszokat [236-239].

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az LPS-sel kezelt moDS-ek IL-10 termelése gátolható mirisztinsav jelenlétében. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy az RD-LPS készítmények magasabb mirisztinsav tartalma hozzájárulhatott az RD-LPS-nek kitett moDS-ek alacsonyabb IL-10 termeléséhez. Az alacsonyabb IL-10 szint miatt az RD-LPS-nek kitett moDS-ek nagyobb mértékben voltak képesek indukálni az IFN- γ -t termelő Th1 sejteket a ko-kultúrákban, szemben az LPS natív formájával kezelt DS-ekkel.

Számos korábbi tanulmány vizsgálta állatmodellekben, hogy az LPS kezelés hogyan befolyásolhatja az allergének által kiváltott immunválaszokat [138,224,240,241]. Így végezetül kíváncsiak voltunk arra, hogy az RD-LPS pre-expozíció képes-e gátolni a parlagfű pollen által kiváltott allergiás gyulladást egerekben. Kísérleti rendszerünkben az RD-LPS-sel végzett hosszan tartó előkezelés (70 nap) képes volt jelentősen csökkenteni a parlagfű pollen által kiváltott légúti eozinofiliát hathetes BALB/c egerekben. A korábbi vizsgálatokkal

ellentétben nem észleltük az endotoxin natív formájának védő hatását az allergiás gyulladásra, csak a méregtelenített forma bizonyult hatékony profilaktikus szernek [242,243]. A korábbi vizsgálatokban, melyek az endotoxinok hatásait vizsgálják allergiás gyulladásokban, számos eltérés van a felhasznált allergének fajtaiban és koncentrációjában, a szennyező vagy hozzáadott LPS eredetében és mennyiségében, valamint az allergének szenzibilizációjának protokolljában. Továbbá a mintavétel ideje és az allergénnel történő kezelés utáni mintafeldolgozás útja és a vizsgált paraméterek is eltérőek. Ez lehet az oka annak, hogy a különböző laboratóriumok néha egymásnak ellentmondó eredményeket publikálnak az LPS allergiás gyulladásra gyakorolt hatásairól [122]. Mi a kísérleteinkben újszerű módon az LPS-t aeroszol formájában alkalmaztuk az allergén expozíció előtt, amely lehetővé tette az endotoxin eloszlását a laboratóriumi állatok környezetében, beleértve az almot, az ételt és az italt. Ez a technika segített abban, hogy jobban elősegítsük a környezet renaturációját és modellezzük azokat a körülményeket, amit az állattartó gazdaságok környezete jellemez, ahol az LPS szintek jelentősen magasabbak, mint a belvárosi otthonokban [114]. Így az egerek endotoxin expozíciója nemcsak belégzéssel, hanem szájon át is megtörténik. Mind a belégzéssel, mind a szájon át történő endotoxin kezeléssel megállapították, hogy hozzájárul az atópia megelőzéséhez [110,136,139]. Fontos azonban kiemelni, hogy az endotoxinok védő hatásai két kritikus időszakban a legerősebbek: a születés előtti időszakban és a korai gyermekkorban. A legtöbb tanulmányban a születés utáni időablak egerek esetében az első 3 hétre, míg emberek esetében az első életévre vonatkozik [119,137]. Mi kísérleteinkben hathetes egerek esetében is tapasztaltuk az RD-LPS allergia elleni prevenciós hatását. Néhány tanulmány ugyanis kimutatta, hogy az LPS-expozíció védő hatásai egerekben felnőttkorban is fennmaradhatnak [240,241].

Eredményeink arra utalnak, hogy az RD-LPS hatékonyabb és biztonságosabb megközelítés lehet az atópia megelőzésére. Valószínűleg a natív LPS-hez képest, az RD-LPS nagyobb Th1 sejt polarizáló képessége elősegítheti a Th2-típusú gyulladás Th1 irányba történő eltolódását, ami gátolja a Th2 mediált allergiás folyamatok kialakulását. Így feltételezzük, hogy az RD-LPS rendszeres aeroszol formájában történő alkalmazása hozzájárulhatna a városi környezet renaturálásához és ezáltal csökkenthetné az allergiás megbetegedések kialakulásának esélyét. Azonban fontos megjegyezni, hogy az RD-LPS kezelés csak az első életévben lehet hatásos, amikor a külső mikrobiális ingerekre való fogékonyság még fennáll.

VII. Összefoglalás

A replikálódó vírusok felismeréséhez a DS-ek citoplazmatikus retinsav-indukálható gén (RIG) I-szerű receptorokat (RLR) használnak, amelyek alapvető szerepet játszanak a vírusellenes immunválaszok későbbi aktiválásában. Elsőként a rapamycin emlős célpontjának (mTOR) endogén szabályozó szerepét kívántuk feltárni a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS-ek) és plazmacitoid DS-ek (pDS-ek) RLR által kiváltott effektor funkcióiban. Eredményeink azt mutatják, hogy az RLR stimuláció megnövelte az mTOR komplexek (mTORC1, mTORC2) downstream célpontjainak, a p70S6 kináznak, illetve az Akt-nak a foszforilációját, amit az mTORC1 inhibitor, a rapamycin, valamint a kettős mTORC1/C2 kináz inhibitor, az AZD8055 mindkét DS altípusban gátolt. Továbbá az mTOR gátlása az moDS-ekben gátolta az RLR stimuláció által kiváltott glikolitikus tranzíciót, ami a laktát termelés gátlásában és a kulcsfontosságú glikolitikus gének csökkent expressziójában nyilvánult meg. Az mTOR blokkolása csökkentette az RLR-stimulált moDS-ek és pDS-ek I-es típusú interferon (IFN) és pro-inflammatorikus citokin termelő képességét, míg a DS-ek fenotípusát nem befolyásolta. Azt is megállapítottuk, hogy az mTOR-blokád csökkentette a Tank-kötő kináz 1 (TBK1) foszforilációját, amely az RLR által vezérelt citokin termelést közvetíti. Emellett a rapamycin gátolta mindkét DS altípus IFN- γ és granzim B termelő CD8⁺ T-sejt proliferációját és differenciálódását indukáló képességét, amire az AZD8055 nem volt képes. Így megállapítottuk, hogy az mTOR pozitívan szabályozza a humán DS-ek RLR által közvetített vírusellenes aktivitását, továbbá rávilágítottunk az mTORC1 szelektív és a kettős mTORC1/C2 gátlás különbségeire, amit figyelembe kell venni az új generációs mTOR-inhibitorok fejlesztése során. Ezt követően a környezetben található endotoxinok immunmoduláló hatását vizsgáltuk DS-eken, mivel megfigyelések szerint a gyermekkori környezeti endotoxin-expozíció védelmet nyújthat a Th2-mediált allergiás betegségek kialakulása ellen. Így vizsgálni kívántuk, hogy a beltéri környezet aeroszolizált, sugárzással méregtelenített lipopoliszachariddal (RD-LPS) történő renaturálása megelőzheti-e a parlagfű okozta Th2-típusú légúti gyulladás kialakulását. Mivel a DS-ek döntő szerepet játszanak a T-sejtválaszok polarizációjában, elsőként *in vitro* kísérleteinkben a natív LPS (N-LPS) és az RD-LPS hatását hasonlítottuk össze humán moDS-eken. Kimutattuk, hogy az RD-LPS-nek kitett moDS-ek nagyobb Th1-polarizáló képességgel rendelkeznek, mint az N-LPS-nek kitett moDS-ek. *In vivo* kísérletek során hathetes BALB/c egerek ketreceit naponta kezeltük aeroszolizált N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel. Tíz hetes kezelési időszak után az egereket

szenzibilizáltuk és parlagfűpollen-kivonattal provokáltuk az allergiás gyulladást. Az előzetesen RD-LPS-ben gazdag milióban élő egereknél szignifikánsan kisebb allergiás légúti gyulladás alakult ki, mint az N-LPS-ben gazdag vagy az LPS kezelés nélküli környezetben élő egereknél. Így feltételezhető, hogy korai életkorban a városi beltéri környezet renaturálása aeroszolizált, nem toxikus RD-LPS-sel alkalmas lehet a Th2-mediált allergiák megelőzésére.

Summary

To detect replicating viruses, dendritic cells (DCs) utilize cytoplasmic retinoic acid inducible gene-(RIG) I-like receptors (RLRs), which play an essential role in the subsequent activation of antiviral immune responses. First, we aimed to explore the endogenous regulatory role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in RLR-triggered effector functions of human monocyte-derived DCs (moDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs). Our results show that RLR stimulation increased the phosphorylation of the mTOR complex (mTORC) 1 and mTORC2 downstream targets p70S6 kinase and Akt, respectively, which was inhibited by the mTORC1 inhibitor rapamycin as well as the dual mTORC1/C2 kinase inhibitor AZD8055 in both DC subtypes. Furthermore, inhibition of mTOR in moDCs impaired the RLR stimulation-triggered glycolytic switch, which was reflected by the inhibition of lactate production and decreased expression of key glycolytic genes. Blockade of mTOR diminished the ability of RLR-stimulated moDCs and pDCs to secrete type I interferons (IFNs) and pro-inflammatory cytokines, while it did not affect the phenotype of DCs. We also found that mTOR blockade decreased the phosphorylation of Tank-binding kinase 1 (TBK1), which mediates RLR-driven cytokine production. In addition, rapamycin abrogated the ability of both DC subtypes to promote the proliferation and differentiation of IFN- γ and Granzyme B producing CD8⁺ T cells, which AZD8055 was unable to do. Thus, we have found that mTOR positively regulates RLR-mediated antiviral activity of human DCs and highlighted the differences between mTORC1 selective and dual mTORC1/C2 inhibition, which should be considered in the development of new generation of mTOR inhibitors. Subsequently, we investigated the immunomodulatory effects of environmental endotoxins in DC, as observations suggest that childhood environmental endotoxin exposure may protect against the development of Th2-mediated allergic diseases. Thus, we wanted to investigate whether renaturation of the indoor environment with aerosolized radiation-detoxified lipopolysaccharide (RD-LPS) could prevent the development of ragweed-induced Th2-type airway inflammation. As DCs play a crucial role in the polarization of T cell responses, we first compared the effects of native LPS (N-LPS) and RD-LPS on human moDCs in *in vitro* experiments. We showed that RD-LPS-exposed moDCs have a higher Th1-polarizing capacity than N-LPS-exposed moDCs. *In vivo* experiments, cages of six-week-old BALB/c mice were treated daily with aerosolized N-LPS or RD-LPS. After a ten-week treatment period, mice were sensitized and provoked allergic inflammation with ragweed pollen extract. Mice

previously exposed to RD-LPS-rich milieu developed significantly less allergic airway inflammation than mice exposed to N-LPS-rich or LPS-untreated milieu. Consequently, we suppose that the aerosolized, non-toxic RD-LPS applied in early life for the renaturation of urban indoors may be suitable for the prevention of Th2-mediated allergies in childhood.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(2):49. doi:10.1186/s13223-018-0278-1
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973 May 1;137(5):1142-62. doi: 10.1084/jem.137.5.1142.
3. Heath WR, Kato Y, Steiner TM, Caminschi I. Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2019;58:44-52. doi:10.1016/j.coi.2019.04.003
4. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 2013;34(9):440-445. doi:10.1016/j.it.2013.06.001
5. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, et al. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol.* 2017;198(6):2223-2231. doi:10.4049/jimmunol.1601629
6. Segura E. Human dendritic cell subsets: An updated view of their ontogeny and functional specialization. *Eur J Immunol.* 2022;52(11):1759-1767. doi:10.1002/eji.202149632
7. Bigley V, Maisuria S, Cytlak U, et al. Biallelic interferon regulatory factor 8 mutation: A complex immunodeficiency syndrome with dendritic cell deficiency, monocytopenia, and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2234-2248. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.044
8. Cytlak U, Resteu A, Pagan S, et al. Differential IRF8 Transcription Factor Requirement Defines Two Pathways of Dendritic Cell Development in Humans. *Immunity.* 2020 Aug 18;53(2):353-370.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.07.003.
9. Orsini G, Legitimo A, Failli A, et al. Enumeration of human peripheral blood dendritic cells throughout the life. *Int Immunol.* 2012 Jun;24(6):347-56. doi: 10.1093/intimm/dxs006.
10. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013 Sep;140(1):22-30. doi: 10.1111/imm.12117.
11. Villani AC, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356(6335). doi:10.1126/science.aah4573
12. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1109-18. doi: 10.1084/jem.179.4.1109.
13. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol.* 2000;1(4):305-310. doi:10.1038/79747
14. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science.* 1999;284(5421):1835-1837. doi:10.1126/science.284.5421.1835
15. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:275-306. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633.
16. Tang F, Du Q, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Sci China Life Sci.* 2010 Feb;53(2):172-82. doi: 10.1007/s11427-010-0045-0.

17. Shortman K, Sathe P, Vremec D, Naik S, O'Keeffe M. Plasmacytoid dendritic cell development. *Adv Immunol.* 2013;120:105-26. doi: 10.1016/B978-0-12-417028-5.00004-1.
18. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183(1):89-103. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x
19. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):471-485. doi:10.1038/nri3865
20. Cerutti A, Qiao X, He B. Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching, *Immunol. Cell Biol.* 83 (2005) 554–562. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01389.x
21. Bencze D, Fekete T, Pázmándi K. Correlation between Type I Interferon Associated Factors and COVID-19 Severity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18). doi:10.3390/ijms231810968
22. Carmona-Sáez P, Varela N, Luque MJ, et al. Metagene projection characterizes GEN2.2 and CAL-1 as relevant human plasmacytoid dendritic cell models. *Bioinformatics.* 2017;33(23):3691-3695. doi:10.1093/bioinformatics/btx502
23. See P, Dutertre CA, Chen J, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science.* 2017;356(6342). doi:10.1126/science.aag3009
24. Leylek R, Alcántara-Hernández M, Lanzar Z, et al. Integrated Cross-Species Analysis Identifies a Conserved Transitional Dendritic Cell Population. *Cell Rep.* 2019;29(11):3736-3750.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.11.042.
25. Collin M, Milne P. Langerhans cell origin and regulation. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(1):28-35. doi:10.1097/MOH.0000000000000202.
26. Jeras M, Bergant M, Repnik U. In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells - potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. *Transpl Immunol.* 2005 Aug;14(3-4):231-44. doi: 10.1016/j.trim.2005.03.012.
27. Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 2002 Dec 27;111(7):927-30. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01201-1
28. Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 2014 May 16;33(10):1104-16. doi: 10.1002/emboj.201488027.
29. Pearce EJ, Everts B. Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jan;15(1):18-29. doi: 10.1038/nri3771
30. Del Prete A, Zaccagnino P, Di Paola M, et al. Role of mitochondria and reactive oxygen species in dendritic cell differentiation and functions. *Free Radic Biol Med.* 2008 Apr 1;44(7):1443-51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.037.
31. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, et al. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood.* 2010 Jun 10;115(23):4742-9. doi: 10.1182/blood-2009-10-249540.
32. Everts B, Amiel E, Huang SC, et al. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IRF3 supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat Immunol.* 2014 Apr;15(4):323-32. doi: 10.1038/ni.2833.
33. Dang CV, Le A, Gao P. MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 1;15(21):6479-83. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0889.
34. Yu L, Feng Z. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators Inflamm.* 2018 Feb 8;2018:9874109. doi: 10.1155/2018/9874109.

35. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126.
36. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb;30(1):16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976.
37. Oviedo-Boyso J, Bravo-Patiño A, Baizabal-Aguirre VM. Collaborative action of Toll-like and NOD-like receptors as modulators of the inflammatory response to pathogenic bacteria. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:432785. doi: 10.1155/2014/432785.
38. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015.
39. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling as a Promising Therapy for Inflammatory Diseases: A Journey from Molecular to Nano Therapeutics. *Front Physiol*. 2017 Jul 19;8:508. doi: 10.3389/fphys.2017.00508.
40. Blasius AL, Beutler B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):305-15. doi: 10.1016/j.immuni.2010.03.012.
41. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.062
42. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13766-71. doi: 10.1073/pnas.250476497.
43. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*. 2014 Sep 25;5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461
44. Lee SM, Kok KH, Jaume M, et al. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 11;111(10):3793-8. doi: 10.1073/pnas.1324266111.
45. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005 Jan;17(1):1-14. doi: 10.1093/intimm/dxh186.
46. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863.
47. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. 2010 Jun 17;465(7300):885-90. doi: 10.1038/nature09121
48. Jiang Z, Ninomiya-Tsuji J, Qian Y, Matsumoto K, Li X. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol*. 2002 Oct;22(20):7158-67. doi: 10.1128/MCB.22.20.7158-7167.2002.
49. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, et al. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol*. 2003 Feb;4(2):161-7. doi: 10.1038/ni886.
50. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):4304-10. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4304.
51. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP et al. Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Nov;11(11):1060-7. doi: 10.1038/nsmb847.

52. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol.* 2022 Mar 3;13:812774. doi: 10.3389/fimmu.2022.812774.
53. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* 2007 Jul 26;448(7152):501-5. doi: 10.1038/nature06013.
54. Zhang Z, Yuan B, Bao M, et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2011 Sep 4;12(10):959-65. doi: 10.1038/ni.2091.
55. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):291. doi:10.1038/s41392-021-00687-0
56. Radoshevich L, Dussurget O. Cytosolic Innate Immune Sensing and Signaling upon Infection. *Front Microbiol.* 2016 Mar 14;7:313. doi: 10.3389/fmicb.2016.00313.
57. Nagai-Singer MA, Morrison HA, Allen IC. NLRX1 Is a Multifaceted and Enigmatic Regulator of Immune System Function. *Front Immunol.* 2019 Oct 11;10:2419. doi: 10.3389/fimmu.2019.02419.
58. Szabo A, Magyarics Z, Pazmandi K, Gopcsa L, Rajnavolgyi E, Bacsí A. TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(8):671-678. doi:10.1038/icb.2014.38
59. Fekete T, Bencze D, Bíró E, Benkő S, Pázmándi K. Focusing on the Cell Type Specific Regulatory Actions of NLRX1. *Int J Mol Sci.* 2021; Feb;22(3):1316. doi:10.3390/ijms22031316
60. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* 2008 Jul 7;205(7):1601-10. doi: 10.1084/jem.20080091.
61. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol.* 2009 Apr;21(4):317-37. doi: 10.1093/intimm/dxp017
62. Brisse M, Ly H. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. *Front Immunol.* 2019 Jul 17;10:1586. doi: 10.3389/fimmu.2019.01586.
63. Ranji A, Boris-Lawrie K. RNA helicases: emerging roles in viral replication and the host innate response. *RNA Biol.* 2010 Nov-Dec;7(6):775-87. doi: 10.4161/rna.7.6.14249.
64. Loo YM, Gale M Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity.* 2011 May 27;34(5):680-92. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.003.
65. Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(3):539-555. doi:10.1038/s41423-020-00602-7
66. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol.* 2020;20(9):537-551. doi:10.1038/s41577-020-0288-3
67. Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Mar;14(3):133-9. doi: 10.1038/nrm3522.
68. Snyder JP, Amiel E. Regulation of Dendritic Cell Immune Function and Metabolism by Cellular Nutrient Sensor Mammalian Target of Rapamycin (mTOR). *Front Immunol.* 2019 Jan 14;9:3145. doi: 10.3389/fimmu.2018.03145.
69. Jones RG, Pearce EJ. MenTORing Immunity: mTOR Signaling in the Development and Function of Tissue-Resident Immune Cells. *Immunity.* 2017 May 16;46(5):730-742. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.028
70. Diehl N, Schaal H. Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses.* 2013 Dec 16;5(12):3192-212. doi: 10.3390/v5123192.

71. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975 Oct;28(10):721-6. doi: 10.7164/antibiotics.28.721.
72. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012 Apr 13;149(2):274-93. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
73. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017 Mar 9;168(6):960-976. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004. Erratum in: *Cell*. 2017 Apr 6;169(2):361-371. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.035.
74. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*. 2003 Apr;11(4):895-904. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00114-x.
75. Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC Jr. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6;282(27):20036-44. doi: 10.1074/jbc.M702376200
76. Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009 May 29;137(5):873-86. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.046
77. Haidinger M, Poglitsch M, Geyeregger R, et al. A versatile role of mammalian target of rapamycin in human dendritic cell function and differentiation. *J Immunol*. 2010 Oct 1;185(7):3919-31. doi: 10.4049/jimmunol.1000296
78. Sathaliyawala T, O'Gorman WE, Greter M, et al. Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. *Immunity*. 2010 Oct 29;33(4):597-606. doi: 10.1016/j.immuni.2010.09.012
79. Palavra F, Robalo C, Reis F. Recent Advances and Challenges of mTOR Inhibitors Use in the Treatment of Patients with Tuberous Sclerosis Complex. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:9820181. doi: 10.1155/2017/9820181
80. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011 Feb;13(2):132-41. doi: 10.1038/ncb2152
81. Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J*. 2012 Jan 1;441(1):1-21. doi: 10.1042/BJ20110892
82. Dai H, Thomson AW. The "other" mTOR complex: New insights into mTORC2 immunobiology and their implications. *Am J Transplant*. 2019 Jun;19(6):1614-1621. doi: 10.1111/ajt.15320
83. Hare SH, Harvey AJ. mTOR function and therapeutic targeting in breast cancer. *Am J Cancer Res*. 2017 Mar 1;7(3):383-404
84. Weichhart T, Hengstschräger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct;15(10):599-614. doi: 10.1038/nri3901
85. Schmitz F, Heit A, Dreher S, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells. *Eur J Immunol*. 2008 Nov;38(11):2981-92. doi: 10.1002/eji.200838761
86. Cao W, Manicassamy S, Tang H, et al. Toll-like receptor-mediated induction of type I interferon in plasmacytoid dendritic cells requires the rapamycin-sensitive PI(3)K-mTOR-p70S6K pathway. *Nat Immunol*. 2008 Oct;9(10):1157-64. doi: 10.1038/ni.1645.
87. Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJ, et al. Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*. 2008 Mar 20;452(7185):323-8. doi: 10.1038/nature06730

88. Fekete T, Pazmandi K, Szabo A, Bacsı A, Koncz G, Rajnavölgyi E. The antiviral immune response in human conventional dendritic cells is controlled by the mammalian target of rapamycin. *J Leukoc Biol.* 2014 Oct;96(4):579-89. doi: 10.1189/jlb.2A0114-048RR
89. Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity.* 2008 Oct 17;29(4):565-77. doi: 10.1016/j.immuni.2008.08.012
90. Ohtani M, Hoshii T, Fujii H, et al. Cutting edge: mTORC1 in intestinal CD11c⁺ CD11b⁺ dendritic cells regulates intestinal homeostasis by promoting IL-10 production. *J Immunol.* 2012 May 15;188(10):4736-40. doi: 10.4049/jimmunol.1200069
91. Wang H, Brown J, Gu Z, et al. Convergence of the mammalian target of rapamycin complex 1- and glycogen synthase kinase 3- β -signaling pathways regulates the innate inflammatory response. *J Immunol.* 2011 May 1;186(9):5217-26. doi: 10.4049/jimmunol.1002513
92. Amiel E, Everts B, Freitas TC, et al. Inhibition of mechanistic target of rapamycin promotes dendritic cell activation and enhances therapeutic autologous vaccination in mice. *J Immunol.* 2012 Sep 1;189(5):2151-8. doi: 10.4049/jimmunol.1103741
93. Fantus D, Dai H, Ono Y, et al. Influence of the Novel ATP-Competitive Dual mTORC1/2 Inhibitor AZD2014 on Immune Cell Populations and Heart Allograft Rejection. *Transplantation.* 2017 Dec;101(12):2830-2840. doi: 10.1097/TP.0000000000001933
94. Shao S, Cui D, Ma C, et al. Transcriptome profiling of tolerogenic dendritic cells conditioned with dual mTOR kinase inhibitor, AZD8055. *Int Immunopharmacol.* 2020 Apr;81:106241. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106241
95. Everts B, Amiel E, van der Windt GJ, et al. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood.* 2012 Aug 16;120(7):1422-31. doi: 10.1182/blood-2012-03-419747.
96. Wu D, Sanin DE, Everts B, Chen Q, Qiu J, Buck MD, et al. Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function. *Immunity.* 2016 Jun 21;44(6):1325-36. doi: 10.1016/j.immuni.2016.06.006.
97. Basit F, Mathan T, Sancho D, de Vries IJM. Human Dendritic Cell Subsets Undergo Distinct Metabolic Reprogramming for Immune Response. *Front Immunol.* 2018 Nov 1;9:2489. doi: 10.3389/fimmu.2018.02489
98. Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett.* 2017 Oct;591(19):3089-3103. doi: 10.1002/1873-3468.12711.
99. Fülöp V, Demeter J, Cseh Á. Significance and effects of prenatal and postnatal microbiome in the period of early individual development and options for interventional treatment. *Repository of the Academy's Library.* 2021 May 9;162(19):731-740. doi:10.1556/650.2021.32082
100. Sokolowska M, Frei R, Lunjani N, Akdis CA, O'Mahony L. Microbiome and asthma. *Asthma Res Pract.* 2018 Jan 5;4:1. doi: 10.1186/s40733-017-0037-y
101. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* 1989 Nov 18;299(6710):1259-60. doi: 10.1136/bmj.299.6710.1259.
102. von Mutius E. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: farm lifestyles and the hygiene hypothesis. *Clin Exp Immunol.* 2010 Apr;160(1):130-5. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04138.x
103. Frei R, Heye K, Roduit C. Environmental influences on childhood allergies and asthma - The Farm effect. *Pediatr Allergy Immunol.* 2022 Jun;33(6):e138067. doi: 10.1111/pai.13807

104. Von Ehrenstein OS, Von Mutius E, Illi S, Baumann L, et al. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*. 2000 Feb;30(2):187-93. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00801.x
105. Kilpeläinen M, Terho EO, Helenius H, Koskenvuo M. Farm environment in childhood prevents the development of allergies. *Clin Exp Allergy*. 2000 Feb;30(2):201-8. doi: 10.1046/j.1365-2222.2000.00800.x
106. Ernst P, Cormier Y. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1563-6. doi: 10.1164/ajrccm.161.5.9908119
107. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al; GABRIELA Transregio 22 Study Group. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N Engl J Med*. 2011 Feb 24;364(8):701-9. doi: 10.1056/NEJMoa1007302.
108. Illi S, Depner M, Genuneit J, von Mutius E, et al; GABRIELA Study Group. Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments-the GABRIEL Advanced Studies. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jun;129(6):1470-7.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2012.03.013.
109. Pechlivanis S, Depner M, Kirjavainen PV, von Mutius E, et al; PASTURE Study Group. Continuous Rather Than Solely Early Farm Exposure Protects From Hay Fever Development. *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2023 Feb;11(2):591-601. doi: 10.1016/j.jaip.2022.10.035
110. Sipka S, Béres A, Bertók L, Varga T, Bruckner G. Comparison of endotoxin levels in cow's milk samples derived from farms and shops. *Innate Immun*. 2015 Jul;21(5):531-6. doi: 10.1177/1753425914557100.
111. Riedler J, Braun-Fahrländer C, Eder W, von Mutius E, et al; ALEX Study Team. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet*. 2001 Oct 6;358(9288):1129-33. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06252-3
112. Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, et al. Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet*. 2000 May 13;355(9216):1680-3. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02239-x.
113. Gehring U, Bischof W, Fahlbusch B, et al. House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Oct 1;166(7):939-44. doi: 10.1164/rccm.200203-256OC. Erratum in: *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 1;167(1):91.
114. Barnig C, Reboux G, Roussel S, et al. Indoor dust and air concentrations of endotoxin in urban and rural environments. *Lett. Appl. Microbiol*. 2013;56:161–167. doi: 10.1111/lam.12024
115. Nafstad P, Magnus P, Gaarder PI, Jaakkola JJ. Exposure to pets and atopy-related diseases in the first 4 years of life. *Allergy*. 2001 Apr;56(4):307-12. doi: 10.1034/j.1398-9995.2001.00881.x
116. Lauener RP, Birchler T, Adamski J, et al; ALEX study group. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet*. 2002 Aug 10;360(9331):465-6. doi: 10.1016/S0140-6736(02)09641-1
117. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. 2010 Apr;160(1):1-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04139.x
118. Deckers J, Marsland BJ, von Mutius E. Protection against allergies: Microbes, immunity, and the farming effect. *Eur J Immunol*. 2021 Oct;51(10):2387-2398. doi:10.1002/eji.202048938.
119. Gerretsen VIV, Schuijs MJ. The role of LPS and CpG in the farm effect against allergies, and beyond. *Allergol Select*. 2022 Mar 29;6:104-110. doi: 10.5414/ALX02327E.

120. Strieker S, Weinmann T, Gerlich J, et al. Farm living and allergic rhinitis from childhood to young adulthood: Prospective results of the GABRIEL study. *J Allergy Clin Immunol.* 2022 Nov;150(5):1209-1215.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2022.05.027
121. Schuijs MJ, Willart MA, Vergote K, et al. Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science.* 2015 Sep 4;349(6252):1106-10. doi: 10.1126/science.aac6623
122. Zhu Z, Oh SY, Zheng T, Kim YK. Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma. *Clin Exp Allergy.* 2010 Apr;40(4):536-46. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03477.x
123. García LN, Leimgruber C, Nicola JP, et al. Neonatal endotoxin stimulation is associated with a long-term bronchiolar epithelial expression of innate immune and anti-allergic markers that attenuates the allergic response. *PLoS One.* 2020 May 7;15(5):e0226233. doi: 10.1371/journal.pone.0226233
124. Pascal M, Perez-Gordo M, Caballero T, et al. Microbiome and Allergic Diseases. *Front Immunol.* 2018 Jul 17;9:1584. doi: 10.3389/fimmu.2018.01584
125. Buhaş MC, Gavrilăş LI, Candrea R, et al. Gut Microbiota in Psoriasis. *Nutrients.* 2022 Jul 20;14(14):2970. doi: 10.3390/nu14142970
126. Singh RK, Chang HW, Yan D, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017 Apr 8;15(1):73. doi: 10.1186/s12967-017-1175-y
127. Alashkar Alhamwe B, Gao Z, Alhamdan F, et al. Intranasal administration of *Acinetobacter lwoffii* in a murine model of asthma induces IL-6-mediated protection associated with cecal microbiota changes. *Allergy.* 2023 May;78(5):1245-1257. doi: 10.1111/all.15606.
128. Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, et al. Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 22;109(21):8334-9. doi: 10.1073/pnas.1205624109
129. Fiuza BSD, Fonseca HF, Meirelles PM, et al. Understanding Asthma and Allergies by the Lens of Biodiversity and Epigenetic Changes. *Front Immunol.* 2021 Mar 1;12: 623737. doi: 10.3389/fimmu.2021.623737.
130. Douwes J, Pearce N, Heederik D. Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? *Thorax.* 2002; 57:86–90. doi: 10.1136/thorax.57.1.86.
131. Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Mar;109(3):379-92. doi: 10.1067/mai.2002.122157.
132. Doreswamy V, Peden DB. Modulation of asthma by endotoxin. *Clin. Exp. Allergy.* 2011;41:9–19. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03628.x.
133. Michel O, Kips J, Duchateau J, et al. Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 154:1641–1646. doi: 10.1164/ajrccm.154.6.8970348
134. Rizzo MC, Naspitz CK, Fernandez-Caldas E, et al. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. *Pediatr. Allergy Immunol.* 1997;8: 121–126. doi: 10.1111/j.1399-3038.1997.tb00164.x.
135. Park JH, Gold DR, Spiegelman DL, Burge HA, Milton DK. House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Feb;163(2):322-8. doi: 10.1164/ajrccm.163.2.2002088.
136. Williams LK, Ownby DR, Maliarik MJ, Johnson CC. The role of endotoxin and its receptors in allergic disease. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2005;94:323–332. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60983-0

137. Lloyd CM, Saglani S. Opening the Window of Immune Opportunity: Treating Childhood Asthma. *Trends Immunol.* 2019 Sep;40(9):786-798. doi: 10.1016/j.it.2019.07.004
138. Schwarzer M, Srutkova D, Hermanova P, et al. Diet Matters: Endotoxin in the Diet Impacts the Level of Allergic Sensitization in Germ-Free Mice. *PLoS One.* 2017 Jan 4;12(1): e0167786. doi: 10.1371/journal.pone.0167786.
139. Inagawa H, Kohchi C, Soma G. Oral administration of lipopolysaccharides for the prevention of various diseases: benefit and usefulness. *Anticancer Res.* 2011 Jul;31(7):2431-6.
140. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994 Feb; 8(2):217-25. doi: 10.1096/fasebj.8.2.8119492.
141. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 May;2(5):a000414. doi: 10.1101/cshperspect.a000414.
142. Rylander R. Endotoxin in the environment--exposure and effects. *J Endotoxin Res.* 2002;8(4):241-52. doi: 10.1179/096805102125000452
143. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem.* 1985 Apr 1;148(1):1-5. doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08798.x.
144. Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res.* 2003 Nov 14;338(23):2431-47. doi: 10.1016/j.carres.2003.07.010.
145. Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 2002 Jul;4(8):837-51. doi: 10.1016/s1286-4579(02)01604-0.
146. Gorman A, Golovanov AP. Lipopolysaccharide Structure and the Phenomenon of Low Endotoxin Recovery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2022 Nov; 180:289-307. doi: 10.1016/j.ejpb.2022.10.006.
147. Caroff M, Novikov A. Lipopolysaccharides: Structure, function and bacterial identification. *OCL.* 2020.27:31. doi: 10.1051/ocl/2020025
148. Coats SR, Berezow AB, To TT, et al. The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. *Infect Immun.* 2011 Jan;79(1):203-10. doi: 10.1128/IAI.00937-10.
149. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A Modification Systems in Gram-negative Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 2007; 76, 295–329. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803.
150. Okan NA, Kasper DL. The atypical lipopolysaccharide of Francisella. *Carbohydr. Res.* 2013;378:79–83. doi: 10.1016/j.carres.2013.06.015.
151. Zughaier S, Agrawal S, Stephens DS, Pulendran B. Hexa-acylation and KDO(2)-glycosylation determine the specific immunostimulatory activity of Neisseria meningitidis lipid A for human monocyte derived dendritic cells. *Vaccine.* 2006 Feb 27;24(9):1291-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.09.039.
152. Pupo E, Lindner B, Brade H, Schromm AB. Intact Rough- and Smooth-form Lipopolysaccharides from Escherichia Coli Separated by Preparative Gel Electrophoresis Exhibit Differential Biologic Activity in Human Macrophages. *FEBS J.* 2013; 280:1095–1111. doi: 10.1111/febs.12104.
153. Park BS, Song DH, Kim HM, et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature.* 2009 Apr 30;458(7242):1191-5. doi: 10.1038/nature07830
154. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.

155. Ryu JK, Kim SJ, Rah SH, et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*. 2017 Jan 17;46(1):38-50. doi: 10.1016/j.immuni.2016.11.007
156. Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 7;21(2):379. doi: 10.3390/ijms21020379.
157. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell*. 2020 Mar 19;180(6):1044-1066. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.041.
158. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Feb;78(4):1233-1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.
159. Swanson, KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019 Aug;19(8):477-489. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0
160. Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect*. 2004 Dec;6(15):1361-7. doi: 10.1016/j.micinf.2004.08.015.
161. Fekete T, Szabo A, Beltrame L, et al. Constraints for monocyte-derived dendritic cell functions under inflammatory conditions. *Eur J Immunol*. 2012 Feb;42(2):458-69. doi: 10.1002/eji.201141924.
162. Bertók, L. Az endotoxin szerepe a természetes immunitásban. *Magyar Tudomány* 2004/10 1130. oldal
163. Stearns-Kurosawa DJ, Osuchowski MF, Valentine C, Kurosawa S, Remick DG. The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:19-48. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130327.
164. Virzì GM, Mattiotti M, de Cal M, Ronco C, et al. Endotoxin in Sepsis: Methods for LPS Detection and the Use of Omics Techniques. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Dec 27;13(1):79. doi: 10.3390/diagnostics13010079.
165. Erridge C, Stewart J, Bennett-Guerrero E, et al. The biological activity of a liposomal complete core lipopolysaccharide vaccine. *J. Endotoxin Res*. 2002; 8:39–46. doi: 10.1177/09680519020080010401
166. Xi L. Nitric oxide-dependent mechanism of anti-ischemic myocardial protection induced by monophosphoryl lipid A. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 1999 Oct;20(10):865-71.
167. Puggioni F, Durham SR, Francis JN. Monophosphoryl lipid A (MPL) promotes allergen-induced immune deviation in favour of Th1 responses. *Allergy*. 2005 May;60(5):678-84. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00762.x.
168. Alving CR, Rao M, Steers NJ, et al. Liposomes containing lipid A: an effective, safe, generic adjuvant system for synthetic vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2012 Jun;11(6):733-44. doi: 10.1586/erv.12.35.
169. Toyoda T, Kassell NF, Lee KS. Induction of tolerance against ischemia/reperfusion injury in the rat brain by preconditioning with the endotoxin analog diphosphoryl lipid A. *J Neurosurg*. 2000 Mar;92(3):435-41. doi: 10.3171/jns.2000.92.3.0435
170. van der Ley P, Steeghs L, Hamstra HJ, et al. Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect Immun*. 2001 Oct;69(10):5981-90. doi: 10.1128/IAI.69.10.5981-5990.2001.
171. Zariri A, van der Ley P. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2015 Jun;14(6):861-76. doi: 10.1586/14760584.2015.1026808.

172. Najafzadeh F, Tanomand A, Haddadi A, Majidi J. Immunological Properties of Exotoxin A Toxoid - Detoxified Lipopolysaccharide - Gold Nanoparticles Conjugate Against *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Iran J Immunol*. 2021 Dec;18(4):292-303. doi: 10.22034/IJI.2021.87816.1832.
173. Li X, Qu S, Song X, Wu C, Shen J, Zhu K. In Situ Neutralization and Detoxification of LPS to Attenuate Hyperinflammation. *Adv Sci (Weinh)*. 2023 Sep;10(26):e2302950. doi: 10.1002/advs.202302950.
174. Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun*. 1983 Jul;41(1):190-6. doi: 10.1128/iai.41.1.190-196.1983.
175. Csako G, Suba EA, Ahlgren A, et al. Relation of structure to function for the U. S. reference standard endotoxin after exposure to 60Co radiation. *J Infect Dis*. 1986 Jan;153(1):98-108. doi: 10.1093/infdis/153.1.98.
176. Csako G, Suba EA, Tsai CM, et al. Dose-dependent changes in the antigenicity of bacterial endotoxin exposed to ionizing radiation. *J Clin Lab Immunol*. 1987 Dec;24(4):193-8
177. Sali W., Patoli D., Pais de Barros J.P., et al. Polysaccharide Chain Length of Lipopolysaccharides From *Salmonella* Minnesota Is a Determinant of Aggregate Stability, Plasma Residence Time and Proinflammatory Propensity in vivo. *Front. Microbiol*. 2019;10:1774. doi: 10.3389/fmicb.2019.01774.
178. Elekes E, Lüderitz O, Galanos C, Bertók L. Alterations in the chemical composition and antigenicity of *Escherichia coli* O89 lipopolysaccharide and lipid A after 60Co gamma irradiation. *Acta Microbiol Hung*. 1988;35(3):301-5.
179. Kubasova T, Bertók L, Köteles GJ. Modifying effects of the parent and radio-detoxified endotoxins on cell-mediated cytotoxicity and cytokine release. *Acta Microbiol Hung*. 1993;40(3):249-54.
180. Hegyesi H, Sándor N, Sáfrány G, et al. Radio-detoxified LPS alters bone marrow-derived extracellular vesicles and endothelial progenitor cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Oct 29;10(1):313. doi: 10.1186/s13287-019-1417-4.
181. Sólyom F, Bertók L. Application of radio-detoxified endotoxin as adjuvant for experimental foot-and-mouth disease vaccine. *Acta Microbiol Hung*. 1985;32(3):233-9.
182. Ongrádi J, Hadden JW, Bertók L, Specter S, Nelson R, Friedman H. HIV-1 fertőzöttek lymphocytáinak in vitro együttes serkentetősége inozin származékokkal és sugárdetoxikált endotoxinnal [In vitro synergic lymphocyte stimulation in HIV-1 infected patients using inosine derivatives and radio-detoxified endotoxin]. *Orv Hetil*. 1995 Mar 19;136(12):653-9. Hungarian.
183. Bertók L. Radio-detoxified endotoxin as a potent stimulator of nonspecific resistance. *Perspect Biol Med*. 1980 Autumn;24(1):61-6. doi: 10.1353/pbm.1980.0090.
184. Bertók L. Radio-detoxified endotoxin activates natural immunity: a review. *Pathophysiology*. 2005 Sep;12(2):85-95. doi: 10.1016/j.pathophys.2005.02.004.
185. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):248-55. doi: 10.4049/jimmunol.176.1.248
186. Westphal O., Lüderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Zeitschrift für Naturforschung B*. 1952; 7, 148–155. doi: 10.1515/znb-1952-0303.
187. Apicella MA. Isolation and characterization of lipopolysaccharides. *Methods Mol Biol*. 2008;431:3-13. doi: 10.1007/978-1-60327-032-8-1.

188. Rezania S., Amirmozaffari N., Tabarraei B., et al. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2011; 3 :3–9.
189. Puljic R, Benediktus E, Plater-Zyberk C, et al. Lipopolysaccharide-induced lung inflammation is inhibited by neutralization of GM-CSF. *Eur J Pharmacol.* 2007 Feb 28;557(2-3):230-5. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.023.
190. Fekete T, Sütő MI, Bencze D, Mázló A, Szabo A, Biro T, Bacsí A, Pazmandi K. Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells Display Distinct Metabolic Profile Upon RIG-I Activation. *Front Immunol.* 2018 Dec 21; 9:3070. doi: 10.3389/fimmu.2018.03070.
191. Kelly B, O'Neill LA. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell Res.* 2015 Jul;25(7):771-84. doi: 10.1038/cr.2015.68.
192. Sparrer KM, Gack MU. Intracellular detection of viral nucleic acids. *Curr Opin Microbiol.* 2015 Aug;26:1-9. doi: 10.1016/j.mib.2015.03.001.
193. Ahmad L, Zhang SY, Casanova JL, Sancho-Shimizu V. Human TBK1: A Gatekeeper of Neuroinflammation. *Trends Mol Med.* 2016 Jun;22(6):511-527. doi: 10.1016/j.molmed.2016.04.006.
194. Yu T, Yi YS, Yang Y, et al. The pivotal role of TBK1 in inflammatory responses mediated by macrophages. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:979105. doi: 10.1155/2012/979105.
195. Mikkelsen SS, Jensen SB, Chiliveru S, et al. RIG-I-mediated activation of p38 MAPK is essential for viral induction of interferon and activation of dendritic cells: dependence on TRAF2 and TAK1. *J Biol Chem.* 2009 Apr 17;284(16):10774-82. doi: 10.1074/jbc.M807272200
196. Haeryfar SM. The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? *Trends Immunol.* 2005 Jun;26(6):311-7. doi: 10.1016/j.it.2005.04.002.
197. Carmona-Saez P, Varela N, Luque MJ, et al. Metagene projection characterizes GEN2.2 and CAL-1 as relevant human plasmacytoid dendritic cell models. *Bioinformatics.* 2017 Dec 1;33(23):3691-3695. doi: 10.1093/bioinformatics/btx502.
198. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, et al. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood.* 2009 Aug 27;114(9):1794-802. doi: 10.1182/blood-2009-04-216770.
199. Agod Z, Fekete T, Budai MM, et al. Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells. *Redox Biol.* 2017 Oct;13:633-645. doi: 10.1016/j.redox.2017.07.016.
200. Rozengurt E, Soares HP, Sinnet-Smith J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2014 Nov;13(11):2477-88. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0330.
201. Matsue H, Edelbaum D, Shalhevet D, et al. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol.* 2003 Sep 15;171(6):3010-8. doi: 10.4049/jimmunol.171.6.3010.
202. Ben-Sasson SZ, Hu-Li J, Quiel J, et al. IL-1 acts directly on CD4 T-cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106:7119–7124. doi: 10.1073/pnas.0902745106.
203. Schulke S. Induction of Interleukin-10 Producing Dendritic Cells As a Tool to Suppress Allergen-Specific T Helper 2 Responses. *Front. Immunol.* 2018; 9:455. doi: 10.3389/fimmu.2018.00455.

204. Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, Ii M. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol. Pharmacol.* 2011; 79:34–41. doi: 10.1124/mol.110.068064
205. Medvedev AE, Lentsch A, Wahl LM, et al. Dysregulation of LPS-induced Toll-like receptor 4-MyD88 complex formation and IL-1 receptor-associated kinase 1 activation in endotoxin-tolerant cells. *J. Immunol.* 2002; 169:5209–5216. doi: 10.4049/jimmunol.169.9.5209
206. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, et al. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Investig.* 2000; 106:551–559. doi: 10.1172/JCI8107.
207. Ciprandi G., Vizzaccaro A., Cirillo I., et al. Nasal eosinophils display the best correlation with symptoms, pulmonary function and inflammation in allergic rhinitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2005; 136:266–272. doi: 10.1159/000083953.
208. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* 2015; 33:257-90. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240
209. Chuluunbaatar U, Mohr I. A herpesvirus kinase that masquerades as Akt: you don't have to look like Akt, to act like it. *Cell Cycle.* 2011 Jul 1;10(13):2064-8. doi: 10.4161/cc.10.13.16242
210. Le Sage V, Cinti A, Amorim R, Mouland AJ. Adapting the Stress Response: Viral Subversion of the mTOR Signaling Pathway. *Viruses.* 2016 May 24;8(6):152. doi: 10.3390/v8060152.
211. Ohman T, Soderholm S, Paidikondala M, et al. Phosphoproteome characterization reveals that Sendai virus infection activates mTOR signaling in human epithelial cells. *Proteomics.* (2015) 15:2087–97. doi: 10.1002/pmic.201400586.
212. Dyall J, Gross R, Kindrachuk J, et al. Middle East respiratory syndrome and severe acute respiratory syndrome: current therapeutic options and potential targets for novel therapies. *Drugs.* (2017) 77:1935–66. doi: 10.1007/s40265-017-0830-1
213. Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol.* (2012) 86:2900–10. doi: 10.1128/JVI.05738-11
214. Mukhopadhyay S, Frias MA, Chatterjee A, et al. The enigma of rapamycin dosage. *Mol Cancer Ther.* 2016 15:347–53. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0720
215. Rosborough BR, Raich-Regue D, Matta BM, et al. Murine dendritic cell rapamycin-resistant and rictor-independent mTOR controls IL-10, B7-H1, and regulatory T-cell induction. *Blood.* 2013 121:3619–30. doi: 10.1182/blood-2012-08-448290
216. Soares HP, Ming M, Mellon M, et al. Dual PI3K/mTOR inhibitors induce rapid overactivation of the MEK/ERK pathway in human pancreatic cancer cells through suppression of mTORC2. *Mol Cancer Ther.* 2015 14:1014–23. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0669
217. Watson AR, Dai H, Diaz-Perez JA, et al. mTORC2 deficiency in cutaneous dendritic cells potentiates CD8(+) effector T cell responses and accelerates skin graft rejection. *Am J Transplant.* 2019 19:646–61. doi: 10.1111/ajt.15083
218. Raich-Regue D, Rosborough BR, Watson AR, et al. mTORC2 Deficiency in myeloid dendritic cells enhances their allogeneic Th1 and Th17 stimulatory ability after TLR4 ligation in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2015 194:4767–76. doi: 10.4049/jimmunol.1402551
219. Pascual J, Royuela A, Fernandez AM, et al. Role of mTOR inhibitors for the control of viral infection in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* (2016) 18:819–31. doi: 10.1111/tid.12601

220. Kim SH, Jung HH, Lee CK. Generation, characteristics and clinical trials of Ex vivo generated tolerogenic dendritic cells. *Yonsei Med J.* (2018) 59:807–15. doi: 10.3349/ymj.2018.59.7.807
221. Boutouja F, Stiehm CM, Platta HW. mTOR: a cellular regulator interface in health and disease. *Cells.* (2019) 8:18. doi: 10.3390/cells8010018
222. Horner AA. Toll-like receptor ligands and atopy: a coin with at least two sides. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 May;117(5):1133–40. doi: 10.1016/j.jaci.2006.02.035
223. von Mutius E. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology.* 2007;212(6):433–9. doi: 10.1016/j.imbio.2007.03.002.
224. Matsushita H., Ohta S., Shiraishi H., et al. Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells. *Int. Immunol.* 2010; 22:739–747. doi: 10.1093/intimm/dxq062
225. Natarajan S, Kim J, Bouchard J, et al. Pulmonary endotoxin tolerance protects against cockroach allergen-induced asthma-like inflammation in a mouse model. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2012; 158:120–130. doi: 10.1159/000330896
226. del Fresno C, Garcia-Rio F, Gomez-Pina V, et al. Potent phagocytic activity with impaired antigen presentation identifying lipopolysaccharide-tolerant human monocytes: Demonstration in isolated monocytes from cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* 2009; 182:6494–6507. doi: 10.4049/jimmunol.0803350
227. Nahid M.A., Satoh M., Chan E.K. MicroRNA in TLR signaling and endotoxin tolerance. *Cell Mol. Immunol.* 2011; 8:388–403. doi: 10.1038/cmi.2011.26.
228. Fux A.C., Casonato Melo C., Michelini S., et al. Heterogeneity of Lipopolysaccharide as Source of Variability in Bioassays and LPS-Binding Proteins as Remedy. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24:8395. doi: 10.3390/ijms24098395
229. Moore KW, de Waal Malefyt R., Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 és az interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19, 683–765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
230. T R Mosmann, J H Schumacher, D F Fiorentino, et al. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6, and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. *J Immunol* 1 November 1990; 145 (9): 2938–2945. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.145.9.2938>
231. Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med.* 1999 Jul 19;190(2):229–39. doi: 10.1084/jem.190.2.229.
232. Palma JP, Yauch RL, Kang HK, et al. Preferential induction of IL-10 in APC correlates with a switch from Th1 to Th2 response following infection with a low pathogenic variant of Theiler's virus. *J Immunol.* 2002 Apr 15;168(8):4221–30. doi: 10.4049/jimmunol.168.8.4221
233. Webster HC, Gamino V, Andrusaitė AT, et al. Tissue-based IL-10 signalling in helminth infection limits IFNγ expression and promotes the intestinal Th2 response. *Mucosal. Immunol.* 2022; 15:1257–1269. doi: 10.1038/s41385-022-00513-y
234. Laouini D, Alenius H, Bryce P, et al. IL-10 is critical for Th2 responses in a murine model of allergic dermatitis. *J. Clin. Investig.* 2003; 112:1058–1066. doi: 10.1172/JCI18246
235. Radzikowska U, Rinaldi A.O, Celebi Sozener Z, et al The Influence of Dietary Fatty Acids on Immune Responses. *Nutrients.* 2019; 11:2990. doi: 10.3390/nu11122990.
236. Altieri C, Cardillo D, Bevilacqua A, Sinigaglia M. Inhibition of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. by fatty acids and their monoglycerides. *J. Food Prot.* 2007; 70:1206–1212. doi: 10.4315/0362-028X-70.5.1206.

237. Liu S, Ruan W, Li J, et al. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia*. 2008; 166:93–102. doi: 10.1007/s11046-008-9124-1.
238. Prasath KG, Alexpandi R, Parasuraman R, et al. Anti-inflammatory potential of myristic acid and palmitic acid synergism against systemic candidiasis in *Danio rerio* (Zebrafish) *Biomed Pharmacother*. 2021; 133:111043. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111043
239. Jia M, Wang Y, Wang J, et al. Myristic acid as a checkpoint to regulate STING-dependent autophagy and interferon responses by promoting N-myristoylation. *Nat. Commun*. 2023; 14:660. doi: 10.1038/s41467-023-36332-3.
240. Ding F, Liu B, Niu C, et al. Low-Dose LPS Induces Tolerogenic Treg Skewing in Asthma. *Front Immunol*. 2020 Sep 23; 11:2150. doi: 10.3389/fimmu.2020.02150.
241. Gao L, Wu M, Liu H, et al. Neonatal LPS Administered Before Sensitization Reduced the Number of Inflammatory Monocytes and Abrogated the Development of OVA-Induced Th2 Allergic Airway Inflammation. *Front Immunol*. 2021 Sep 22;12: 725906. doi: 10.3389/fimmu.2021.725906.
242. Cochran JR, Khan AM, Elidemir O, et al. Influence of lipopolysaccharide exposure on airway function and allergic responses in developing mice. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Oct;34(4):267-77. doi: 10.1002/ppul.10161
243. Daan de Boer J, Roelofs JJ, de Vos AF, et al. Lipopolysaccharide inhibits Th2 lung inflammation induced by house dust mite allergens in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Mar;48(3):382-9. doi: 10.1165/rcmb.2012-0331OC

IX. Kulcsszavak

dendritikus sejt, plazmacitoid dendritikus sejt, monocita-eredetű dendritikus sejt, TLR, RLR, mTOR, RIG-I, MDA5, antivirális válasz, I-es típusú interferon, gyulladásos válasz, parlagfű, allergia, lipopoliszacharid (LPS), sugárzással méregtelenített LPS (RD-LPS), BALB/c egerek

Keywords

dendritic cell, plasmacytoid dendritic cell, monocyte-derived dendritic cell, TLR, RLR, mTOR, RIG-I, MDA5, antiviral response, type I interferon, inflammatory response, ragweed, allergy, lipopolysaccharide (LPS), radiation-detoxified LPS (RD-LPS), BALB/c mice

X. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/376/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ágics Beatrix
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10076937

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bácsi, A.*, **Ágics, B.***, Pázmándi, K. L., Kocsis, B., Sándor, V., Bertók, L., Bruckner, G., Sipka, S.:
Radiation-Detoxified Form of Endotoxin Effectively Activates Th1 Responses and Attenuates
Ragweed-Induced Th2-Type Airway Inflammation in Mice.
Int. J. Mol. Sci. 25 (3), 1-22, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25031581>
* Megosztott első szerzős közlemény.
IF: 5.6 (2022)
2. Fekete, T., **Ágics, B.**, Bencze, D., Bene, K., Szántó, A., Tarr, T., Veréb, Z., Bácsi, A., Pázmándi,
K. L.: Regulation of RLR-Mediated Antiviral Responses of Human Dendritic Cells by mTOR.
Front. Immunol. 11, 1-20, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.572960>
IF: 7.561





További közlemények

3. Pázmándi, K. L., **Ágics, B.**, Szöllősi, A. G., Bácsi, A., Fekete, T.: Ginger-derived bioactive compounds attenuate the Toll-like receptor mediated responses of human dendritic cells.
Eur. J. Pharmacol. 967, 1-16, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176399>
IF: 5 (2022)
4. Bencze, D., Fekete, T., **Ágics, B.**, Pázmándi, K. L.: A vírusok ellenségei: a humán plazmacitoid dendritikus sejtek.
Immunol. Szle. 12 (2), 4-20, 2020.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,161

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
13,161**

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

Debrecen, 2024.06.20.



XI. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Pázmándi Kitti Lindának, akinek kiemelkedő szakmai iránymutatása, segítsége és támogatása tette lehetővé, hogy ez az értekezés létrejöjjön. Köszönetemet fejezem ki Dr. Fekete Tündének, aki szakmai felkészülésemhez és a kísérletek tervezéséhez és megvalósításához nyújtott nagy segítséget. Köszönöm Berki-Pál Angélának a támogatását, mellyel laboratóriumi munkámat segítette. Köszönöm Dr. Bencze Dórának a példamutatását és biztatását. Szeretnék továbbá köszönetet mondani Prof. Dr. Bácsi Attilának, aki lehetőséget biztosított arra, hogy PhD tanulmányaimat és az értekezésemhez szükséges kísérleteket az Immunológiai Intézetben végezhessem.

Továbbá köszönettel tartozom Prof. Dr. Sipka Sándornak és Prof. Dr. Bruckner Gézának, akik az RD-LPS hatásait széleskörűen tanulmányozták és a közlemény megszületéséhez nélkülözhetetlen szakmai megalapozást nyújtottak.

Külön köszönet illeti Prof. Dr. Kocsis Bélát és Dr. Sándor Viktort, akik nagy segítségünkre voltak a kísérletek során az LPS-kivonatok tömegspektrometriás analízise révén.

Köszönöm édesanyám, családom, barátaim támogatását, akik az évek során mindig mellettem álltak. Külön köszönöm nagymamám mérhetetlen segítségét, mellyel végigkísérte tanulmányaimat.

A dolgozat Prof. Dr. Bertók Lóránd emlékét őrzi, aki az „RD-LPS atyja” volt.