

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A RIPK1-függő sejthalál szerepe az immunválasz szabályozásában

Varga Zsófia

Témavezető: Dr. Koncz Gábor



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2021

A RIPK1-függő sejthalál szerepe az immunválasz szabályozásában

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

Írta: Varga Zsófia okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Koncz Gábor, PhD

Az értekezés bírálói:

tagok: Dr. Kövesdi Dorottya, PhD
Dr. Kókai Endre, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, az MTA rendes tagja
tagok: Prof.Dr. Virág László, az MTA doktora
Prof.Dr. Matkó János, az MTA doktora
Dr. Kövesdi Dorottya, PhD
Dr. Kókai Endre, PhD

Az értekezés védésének online időpontja: 2021.05.19. 10:00

A nyilvánosságot online biztosítjuk. Amennyiben az online vitán részt kíván venni, úgy jelezze a
varga.zsofia@med.unideb.hu e-mail címen.

1.Bevezetés

Az utóbbi években több, az apoptózistól független sejthalál útvonalat írtak le. Ismert, hogy a sejthalál folyamatok immunológiai kimenetele eltérő lehet. Az általában tolerogén apoptózis mellett gyulladást indukáló, ugyanakkor az adaptív immunválaszt aktiváló sejthalál útvonalak is ismertek. A dolgozatban a receptor interacting protein kinase-1 (RIPK1) függő sejthalál folyamatokat, a gyulladást kiváltó nekroptózist és apoptózist tanulmányoztuk.

A veleszületett immunitás kezdeti lépéseit elsősorban a makrofágok és dendritikus sejtek koordinálják. A makrofágok differenciációját a szöveti mikrokörnyezetük határozza meg, amelynek köszönhetően kialakulhatnak pro-inflammatórikus (M1) és anti-inflammatórikus (M2) altípusok. A sejtpopulációk egyensúlya felborulhat betegségek patogenezisében, például a fertőzések, daganatok, krónikus gyulladással vagy autoimmun reakciókban. Ezekben a kórképekben több klinikai vizsgálat célja az M1/M2 arány megváltoztatása. A doktori munka során összehasonlítottuk a humán monocita-eredetű M1 és M2 makrofágok nekroptózisra való érzékenységét. A nekroptózis RIPK1, RIPK3 és mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) jelátviteli útvonalon zajlik, amelyet a RIPK1 ubiquitinációja és foszforilációja egyaránt gátol. A nekroptózis kiváltásához inhibitor of apoptosis (IAP) antagonistát, amely a RIPK1 ubiquitinációját, vagy transforming growth factor- β -activated kinase (TAK1) inhibitor használtunk, amely a RIPK1 foszforilációját gátolja. Eredményeink szerint a TAK1 inhibitor által indukált nekroptózisra az M2 sejtek lényegesen érzékenyebbek, mint az M1 sejtek, ami lehetővé teszi a két alpopuláció egyensúlyának szabályozását.

A veleszületett immunitás másik jelentős sejtpopulációját a dendritikus sejtek (DS-ek) alkotják. Profeszionális antigén prezentálók, melyek folyamatosan pásztázzák a mikrokörnyezetüket, és elhalt, tumoros vagy vírussal fertőzött sejtekből fagocitózissal mintákat gyűjtenek. Az antigéneket a nyirokcsomókba szállítják és naiv T sejteknek prezentálják. Antigén prezentáló és T sejtet aktiváló tulajdonságokon túl ismert, hogy a DS-ek sejtpusztító funkcióval is rendelkeznek. A doktori munka során vizsgáltuk, hogy a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) citotoxikus képessége hogyan változik meg a mintázatfelismerő receptorokon PRR-stimulusok hatására. Kimutattuk, hogy citotoxicitás általában az éretlen, perifériás szövetekben található DS-ekhez köthető. Az aktivált DS felülűszója RIPK1- függő immunogén sejthalált indukál, ami ezáltal lehetőséget biztosít a DS-ek számára a szöveti környezet monitorozására és elősegítheti az intracelluláris kórokozók, valamint a tumor antigének prezentációját.

1.1 A DS citotoxicitás szerepe az immunválasz során

A DS-ek biztosítják az immunrendszer két működési egysége, a természetes és az adaptív immunrendszer közötti kapcsolatot. A szövetek között folyamatosan vándorló éretlen DS-ek professzionális fagocita és antigén prezentáló sejtek, a veleszületett immunrendszer elemeiként elsősorban PRR-okkal képesek felismerni különböző mikrobákat. Az antigén felvételét követően a perifériás szövetekből a nyirokcsomóba vándorolnak, ez alatt érett DS-ekké differenciálódnak és a feldolgozott antigéneket T sejteknek prezentálják. Ennek megfelelően az éretlen DS-ek fő funkciója a fagocitózis, az érett DS-eké pedig az antigének bemutatása. Az érett DS-eken fokozódik a T limfociták aktiválásához szükséges sejt felszíni kostimulátor és az antigén prezentációban szerepet játszó molekulák kifejeződése az éretlen sejtekhez képest. Az elpusztult sejtek fagocitózisával különféle sejtekből származó antigének is bejuthatnak a DS-ekbe, ezáltal a tumor sejtekből felszabaduló vagy a hivatásos antigén prezentáló sejtek fertőzésére képtelen mikrobák fehérjéi is fontos antigén forrást jelenthetnek mind a major histocompatibility complex II (MHC-II), mind pedig az MHC-I molekulákon zajló prezentációhoz.

A DS-ekről a szakirodalomban ismert az antigén prezentáló és T sejtet aktiváló funkciójukon túl a citotoxikus hatásuk is. A DS citotoxikus képessége főként a szövetekben lokalizált éretlen fenotípushoz kapcsolható, ezzel szemben a nyirokcsomóba vándorolt érett sejtek kevésbé citotoxikusak, amelyet mind vérből izolált, mind pedig *in vitro* differenciáltatott DS-ek vizsgálatával megerősítettek. Azonban nem tisztázott még a DS-citotoxicitás alapjául szolgáló molekuláris háttér, illetve, hogy mi lehet a sejtölő képességük pontos fiziológiai funkciója. Különösen váratlan ez a citotoxikus hatás, ha figyelembe vesszük, hogy a kórokozó felismerését követően aktiválódó, érett DS-ek a nyirokcsomóba vándorolnak, így a periférián nagy mennyiségű fertőzött sejt elpusztítására nem lehetnek képesek. A sejtölő hatást a DS-ek kiválthatják szolubilis faktorokkal, mint a tumor necrosis factor α (TNF), Lymphotoxin $\alpha 1\beta 2$, FasL vagy TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) közvetítésével. A DS-ek ezen funkcióját a szolubilis ligandumok kollektív hatásaként, továbbá közvetlen sejt-sejt kapcsolat révén is leírták.

A DS-ek citotoxikus tulajdonsága lehetővé teszi, hogy az immunválasz szabályozóiként működjenek. Egyrészt képesek gátolni bizonyos limfociták expanszióját előregedett vagy autoreaktív limfociták esetében. A DS-ek tekinthetők a természetes immunitás effektor sejtjeinek, sejtölő funkciójukat kimutatták tumoros célsejtekkel szemben is. Továbbá az *in vitro* generált

vagy a vérben keringő éretlen DS-ek számára a célsejtek elpusztítása lehetővé teheti az apoptotikus sejtekből származó antigének gyors fagocitózisát és keresztprezentálását a citotoxikus T sejteknek.

1.2 A makrofágok heterogenitása

A makrofágok kulcsszerepet játszanak a fertőzések elleni védekezésben, a sérült vagy apoptotikus sejtek eltávolításában, illetve a szöveti sérüléseket követő regenerációban. Jól ismert fagocita funkciójukon túl részt vesznek a homeosztázis fenntartásában és az immunválasz szabályozásában; az antigének bemutatásával, citokinek és más biológiailag aktív molekulák előállításával, valamint a T sejtek szabályozásán keresztül is. A makrofágok térben és időben is eltérő szereppel bírhatnak, azáltal, hogy funkcionális tulajdonságaik nem csak az eredetüktől, hanem a szöveti környezetből származó molekuláris jelektől is függenek. Eltérő szöveti környezetben reverzibilis változásokon mehetnek keresztül, amelyet a lokális citokin és PRR-stimulusok vezérelnek. A makrofágok megfelelő ingerek által irányított plaszticitása biztosítja a gyulladásos folyamatok kialakításában és megszüntetésében betöltött dinamikus szerepüket.

1.3 Az M1 és M2 makrofág alpopulációk szerepe az immunválaszban

A makrofágok két jól meghatározható polarizációs állapota ismert, a klasszikusan aktivált M1 és alternatív módon aktivált M2 fenotípussal rendelkező makrofágok csoportja, amelyek különböző faktorokat termelnek, eltérő biológiai funkciókkal és sejtfelszíni markerekkel rendelkeznek. Az M1 sejtek biztosítják az immunrendszer első védelmi vonalát, aktiválják mind a veleszületett, mind az adaptív immunitást. Az M2 makrofágok felelősek a szöveti regeneráció szabályozásáért, részt vesznek az apoptotikus testek eltakarításában és hozzájárulnak az immunszuppresszió kialakításához is. A legújabb kutatások szerint azonban a különféle mikrokörnyezeti feltételek integrációja képes a polarizációs állapotok teljes spektrumát létrehozni az M1 és M2 között.

1.4 Tumorasszociált makrofágok

A tumor mikrokörnyezetbe infiltrálódó immunsejtek egyik legnagyobb populációját a monociták/makrofágok képezik. A szolid tumorokra jellemző a monociták vagy makrofágok toborzása és átprogramozása, amelynek következtében tumorasszociált makrofágok (TAM)

jönnek létre. A TAM-ok segítik a daganatok növekedését és progresszióját, azáltal, hogy fokozzák az angiogenezist, valamint a növekedési faktorok termelését és immunszuppressziót indukálnak. Az immunszuppresszív környezet kialakításához hozzájárul a TAM-ok gyenge antigén prezentáló képessége, az IL-10 és TGF β szekréciója, továbbá képesek aktiválni a regulátor T sejteket (Treg) is.

1.5 A sejthalál immunrendszerre gyakorolt hatása

A humán szervezetben sejtek milliárdjai pusztulnak el naponta különféle sejthalál útvonalakon, amelyre az immunrendszer számos módon reagálhat. Az immunrendszerre gyakorolt hatásuk alapján tolerogén, gyulladásszerű és immunogén típusokat különböztethetünk meg. Ezen sejthalál folyamatok lezajlását különböző molekuláris útvonalak irányítják, amelyek eltérően befolyásolják a természetes és az adaptív immunrendszer működését.

1.6 Az apoptózis

Az apoptózis számos útját leírták, amelyek mindegyike az iniciátor és a végrehajtó kaszpázok aktivációjának függvénye. Morfológiai szempontból az apoptotikus sejtek jellegzetes folyamatsort hajtanak végre: az elpusztuló sejt eltávolodik a környező sejtektől, megszünteti kapcsolatát az extracelluláris mátrixszal, majd lekerekedik. A sejtmembránon kitüremkedések képződnek, a kromatin kondenzálódik, ezt követően pedig a DNS fragmentálódik és 200-250 bázispárnnyi szakaszokra esik szét. Végül létrejönnek az apoptotikus testek, amelyek membránnal határolva tartalmazzák a sejt komponenseit. A sejttartalom nem ürül ki az extracelluláris térbe, ennek megfelelően az apoptózis olyan szabályozott sejthalál (RCD), amelynek általában tolerogén a kimenetele. Azonban az apoptózis korábbi ismereteinkkel ellentétben bizonyos körülmények között immunogén is lehet, indukálhatja az adaptív immunrendszert. Egyes publikációk szerint az apoptotikus sejthalál aktív mechanizmusai hozzájárulhatnak az elpusztuló sejtek immunogénitálásához. Ilyen mechanizmus lehet például a kaszpázok aktív működése által feltárt neoepitópok kialakulása, amelyekről ismert, hogy „előnyben részesülnek” a keresztprezentálás során.

1.7 A TNF α jelátvitel lehetséges kimenetelei

A TNF α , TRAIL, Fas ligand mind a tumor nekrozis szupercsalád tagjai, receptoraik egy extracelluláris ligandkötő, egy transzmembrán és egy intracellulárisan elhelyezkedő DD-ből állnak. A DR-ok aktivációját a specifikus ligandum bekötődése után létrejövő receptor oligomerizáció váltja ki, ami elindítja a jelátviteli kaszkádot. A szakirodalomban TNF receptor (TNFR) szignalizációja ismert a legrészletesebben.

A TNF α receptorhoz kötődésének hatására a TNFR trimerizálódik és konformációja megváltozik, melynek következtében leválik a DD-ről annak gátló fehérjéje, a silencer of death domain (SODD). A gátlás alól felszabadult receptorhoz kötődik a TRADD, ami magához toborozza a RIPK1, a TNF receptor associated factor 2 (TRAF2) és TRAF5 fehérjéket. A TRAF2 a komplexhez kapcsolja az IAP1 és IAP2 ubiquitin ligázokat és a LUBAC fehérje komplexet (HOIL-1, HOIP, and Sharpin) is. Az IAP1 és IAP2 ubiquitinálják (fehérje-fehérje interakciókat segítő K63-as poliubiquitin láncot alkotva) a RIPK1-et annak 377-es lizinjén. Ezen felül a LUBAC további lineáris ubiquitin láncokat kapcsol a K63-as poliubiquitinhez, amely láncokhoz kapcsolódhat a NEMO adapter fehérje. A poliubiquitin láncok és a NEMO pedig az IKK komplexnek (IKK α/β , TBK1/IKK ϵ), valamint a TAK1, TAB2 és TAB3 molekuláknak a toborzását teszik lehetővé, amelyek aktiválják a downstream jelátviteli útvonalak (NF- κ B és MAPK) foszforilációs lépéseit. Az így kialakult fehérje komplex (I.-es típusú komplex) a sejt aktiváció mellett többféle túlélési szignált is közvetít. Egyrészt a transzkripciós faktorok (NF- κ B és MAPK) aktiválásával anti-apoptotikus fehérjék (FLIP, IAP) kifejezését eredményezi, másrészt a TAK1 kináz - és downstream szubsztrátjai - a RIPK1 foszforilálásán keresztül gátolják a RIPK1 közvetített sejthalál szignálokat. A RIPK1 tehát a komplex enzimatikusan inaktív tagjaként, állvány fehérjeként járul hozzá a TNF α -indukált sejtaktivációhoz.

A TNFR aktiválódásának másik lehetséges következménye a sejthalál folyamatok végbemenetele. Amennyiben a TNF α indukált túlélő szignálok nem gátoltak, az I.-es komplex disszociálódik a TNFR1-ről és a citoszólban elhelyezkedő TRADD, a FADD, a FLICE-like inhibitory protein hosszú izoformájával (FLIP_L) és a pro-kaspáz-8 fehérjékkel az úgynevezett II.a komplex (TRADD, FADD, RIPK1, kaspáz-8, FLIP_L) alakul ki. Ebben a komplexben a pro-kaspáz-8 oligomerizálódik, hasítódik és aktiválódik, amely apoptotikus sejthalálhoz vezet. Továbbá a komplex összeszerelődésekor kialakuló FLIP_L és pro-kaspáz-8 heterodimerek, vagy az aktív kaspáz-8 homodimerek hasítják a RIPK1-et és a RIPK3-at. Ezáltal a nekroptózis

elindulását gátolják és biztosítják a tolerogén apoptózis dominanciáját a nekroptotikus sejthalállal szemben.

Ha a RIPK1 deubiquitinált állapotba kerül, megváltozik a II.-es komplex összetétele, ennek elnevezése a komplex IIb. A RIPK1 deubiquitinációja megtörténhet egyrészt a CYLD vagy A20 deubiquitináz aktivációjával, vagy pedig a RIPK1 ubiquitinációját végző IAP fehérjék gátlásával, vagy azok hiányában. A IIb komplexben a TRADD helyett a RIPK1 kapcsolja össze a FADD és pro-kaspáz-8 fehérjéket, ekkor a RIPK1-függő apoptózis zajlik le. A TNF jelátvitel további lehetséges kimenetele a nekroptózis kialakulása, melynek előfeltétele a kaspáz-8 inaktív, gátolt állapota. A TNF által indukált nekroptózisban az előző fejezetekben már ismertetett módon a RIPK1 a RIPK3-mal alkot komplexet (komplex IIc).

Az ubiquitináció mellett a RIPK1 aktivitását a foszforilációs/poszt-transzlációs változásai is módosítják. A nekroptózist elősegítő foszforilációs események mellett, több, a RIPK1-függő sejthalált gátló foszforilációs lépés is ismert, ilyen például a TAK1, a TBK1 és az IKK ϵ általi RIPK1-foszforiláció.

1.8 Az apoptózis gátló fehérjék

Az IAP fehérjék családja részt vesz a sejtek különféle folyamatainak szabályozásában, beleértve a sejthalált, az immun- és gyulladási reakciókat, a sejtek proliferációját, differenciálódását és a motilitását. Ezen folyamatok végrehajtásához az IAP-ék kapcsolatba lépnek kaspázokkal, az NF κ B útvonal szabályozóival, az aktin citoskeleton elemeivel, továbbá transzkripciós faktorokkal is.

Az IAP család tagjainak UBA doménje a K63, illetve egyes esetekben a K48 pozícióban (IAP1) kapcsolt poliubiquitin láncait köthetik meg/ismerhetik fel. Amennyiben az ubiquitinek a K48 pozíción keresztül kapcsolódnak egymáshoz, a célfehérje degradációja következik be. Ha azonban K63 pozícióban található ubiquitinek kapcsolódnak, akkor proteaszómás lebontás helyett különféle folyamatok, fehérje-fehérje interakciók, citoplazmatikus transzport, transzláció vagy a DNS hibajavítás aktiválódhatnak.

Az IAP-ék C-terminálisán található RING domén E3 ubiquitin ligázként funkcionál (E3, az ubiquitin konjugáló enzimsor utolsó tagja). A RING domén teszi lehetővé az -előzetesen E1 által aktivált- ubiquitint hordozó E2 és a célfehérje kapcsolatát és elősegíti az ubiquitin átkerülését a célfehérjére. A IAP-ék ubiquitin ligáz tulajdonságuknak köszönhetően képesek a

fehérjéket (például: Second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC), TRAF, kaszpáz enzimek) K63-as pozícióban, illetve más IAP fehérjéket és saját magukat K48-as pozícióban poli-ubiquitinálni. Az auto-ubiquitináció így a proteasómális lebontásukat idézni elő, ami biztosítja az IAP-ék viszonylag állandó szintjét a sejtekben.

1.9 SMAC mimetikumok, a Birinapant

A mitokondriális SMAC fehérjék mesterségesen előállított változatai a SMAC mimetikumok vagy másnéven IAP antagonisták.

A Birinapant bivalens SMAC mimetikum, amely azon felül, hogy a XIAP-BIR doménjéhez kötődik, képes az aktivált kaszpázokat kiszorítani a XIAP-vel való kölcsönhatásból. Az IAP fehérjecsald tagjai közül az IAP1 és az IAP2 lebomlását indukálja a sejtekben. A Birinapant kezelés hatására a RIPK1 deubiquitinálódik, kialakul a RIPK1-kaspáz-8 fehérje komplex, ami lehetővé teszi a kaszpáz-8 aktivációját.

1.10 A TAK1 szerepe a TNFR által kiváltott jelátvitelben

A TGF- β aktivált kináz 1 (TAK1), a MAPKKK család tagja, részt vesz a természetes és az adaptív immunrendszer szabályozásában és a gyulladásos folyamatok irányításában.

A TAK1 gátló hatást fejt ki a kaszpázokra és az apoptózis elindítására. Ismert, hogy TNF stimulációt követően a TAK1 csökkenti a II.-es komplex kialakulását és/vagy aktiválását. A legújabb tanulmányok több mechanizmust írtak le, amelyen keresztül a TAK1 megvédheti a sejteket a TNF α által indukált apoptózistól. A TAK1 az NF-kB upstream kináza, ezen a transzkripciós úton kiváltja az anti-apoptotikus fehérjék, például a FLIP és az IAP-ék átírását. Ezen kívül a TAK1 közvetlenül is, illetve közvetve, az TAK1-aktivált kinázokon keresztül is foszforilálja a RIPK1-et. Ez a foszforiláció a RIPK1 gátlásához vezet.

1.11 Az immunogén sejthalál

Az immunogén sejthalál (ICD) stressz hatására képes gyulladásos reakciót kiváltani, amely az adaptív immunitás aktiválását és a hosszú távú immunológiai memória kialakulását eredményezi.

Az elpusztult sejtek DS-ek általi fagocitózisa és a bekebelezett antigének keresztprezentációval történő bemutatása is szükséges a citotoxikus T sejt aktivációhoz. A

sejtpusztulás típusa nagymértékben befolyásolja a DS-ek keresztprezentációs képességét. Az elpusztuló sejtek adjuvánsként ható képessége és antigenitása függ a sejthalált és a stresszt előidéző inger tulajdonságaitól, addig az RCD immunogenitása végső soron a haldokló sejtek mikrokozonyezetének is a függvénye.

A kiváltó stimulustól függetlenül az ICD sejthalál forma egyedülálló tulajdonsága, hogy képes aktiválni az adaptív immunválaszt. A folyamat során az antigének lehetnek elhalt sejtek által felszabadított exogén vagy az elpusztuló sejtéből származó endogén antigének. Az ICD-ra jellemző a különböző típusú DAMP-ok felszabadulása, illetve az adott antigénre specifikus immunológiai memória kialakulása.

Az ICD ezeken a DAMP-okon keresztül megszünteti az immunszuppresszív hatású tumor mikrokozonyezetet, azáltal, hogy a daganatos sejtek elpusztulását követően fokozza az antigén prezentálást és a fagocitózist, a kostimulátorok kifejezését és citokinek termelését, mind a tumor, mind pedig az antigén prezentáló sejtekben. Ezek eredményeként képes kiváltani a tumor antigénre-specifikus T sejtek aktiválódását.

1.12 A RIPK1-függő sejthalál immunrendszerre kifejtett immunogén hatása

A keresztprezentáció folyamata lehetővé teszi, hogy a DS-ek az exogén, fagocitált antigéneket, például tumor-eredetű vagy virális fehérjéket jelenítsenek meg az MHC-I-en keresztül. A tumor ellenes immunválasz elindításában az immunogén sejthalál a leghatékonyabb antigéneket generáló sejthalál forma.

A RIPK1-függő jelátvitel mind sejthalál, mind pedig az NF- κ B útvonalakat is beindítja. Ezáltal a haldokló sejtekben zajló gyulladáshos folyamatokkal együtt mozgósítja az immunrendszert a tumoros sejtek ellen. Az elhalt sejtekből DAMP-ok, kemokinek és citokinek is felszabadulnak, amelyek az elpusztuló sejt mikrokozonyezetébe toborzott immunsejteket aktiválják. A DS-ek ezen citokin stimulusok hatására keresztprezentációs útvonalon mutatják be az elpusztult sejtéből származó peptideket. Azonban még kevésbé ismert, az immunogén sejthalál pontosan hogyan befolyásolja a DS-ek keresztprezentáló képességét, mellyel beindítják a CD8⁺ T-sejt válaszokat.

2. Célkitűzések

Az eltérő immunológiai szereppel rendelkező sejthalál típusok közötti átmenetek pontosabb ismerete, illetve szabályozása hozzájárulhat a tumorok eliminációját vagy a gyulladásos betegségek kezelését segítő új terápiák kidolgozásához.

Célkitűzéseink között szerepelt vizsgálni, hogy vajon:

- az eltérő stimulusok alkalmazásakor azonos módon megy-e végbe a sejthalál az M1 és M2 sejtpopulációkban?
- milyen típusú a TAK1 inhibitor és SMAC mimetikum által kiváltott sejthalál az M1 és M2 makrofágokon?
- milyen típusú a TAK1 inhibitor és SMAC mimetikum által kiváltott sejthalál a TAM-szerű sejteken?

Ismert, hogy a DS-ek bizonyos körülmények között citotoxikus hatással rendelkeznek⁶.

Célkitűzéseink között szerepelt vizsgálni, hogy vajon:

- a DS-ek felülűszója képes-e különböző sejtvonalakon citotoxikus hatást kiváltani?
- eltérő-e az érett és az éretlen DS-ek felülűszójának sejtlő hatása?
- a citotoxikus hatást milyen sejthalál receptorok közvetítik?
- milyen mértékben befolyásolja a RIPK1 fehérje jelenléte vagy hiánya a felülűszó által kiváltott sejthalált?

3. Anyagok és módszerek

3.1 Monocita szeparálás humán vércsítményből

Kísérleteink során humán monocita-eredetű dendritikus sejtekkel (moDS) illetve monocita-eredetű makrofágokkal dolgoztunk. A fiziológias sóoldattal hígított humán vércsítményt (buffy-coat) Ficoll-Paque Plus oldatra rétegeztük 1:2 arányban, majd gradiens alapú centrifugálásnak vetettük alá, amellyel a perifériás, vérben keringő mononukleáris sejtek elválaszthatóak. A mosási lépések után a CD14⁺ monocitákat pozitív szeparáláson alapuló módszerrel választottuk el. Ehhez paramágneses gyönggyel konjugált CD14-ellenes antitestet (Miltenyi Biotec) használtunk. A jelölt sejtek kitapadtak az erős mágneses térben lévő speciális szeparáló oszlopra, ahonnan fecskendővel steril centrifugacsőbe eluáltuk a monocitákat.

3.2 Humán monociták differenciálítása dendritikus sejtekké

Az izolált monociták 80 ng/ml ml Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF, Gentauro Molecular Products) és 100 ng/ml IL-4 (PeproTech) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó DS-ekké differenciálódtak szérumentes AIM-V médiumban (Thermo Fischer Scientific) 2.0 x 10⁶ sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciálathoz szükséges GM-CSF-et és IL-4-et a 3. napon pótoltuk a sejtek etetésével.

3.3 Humán monociták differenciálítása IFN dendritikus sejtekké

Az izolált monociták 40 ng/ml GM-CSF és 100 U/ml rhIFN- α (Roferon-A) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó DS-ekké differenciálódtak szérumentes AIM-V médiumban 2.0 x 10⁶ sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciálathoz szükséges GM-CSF-et és rhIFN- α -t a 3. napon pótoltuk a sejtek etetésével.

3.4 Humán monociták differenciálítása dexamethasone dendritikus sejtekké

Az izolált monociták 100 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4 és 0.25 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó dendritikus sejtekké differenciálódtak szérumentes AIM-V médiumban 2.0 x 10⁶ sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciálathoz szükséges GM-CSF-et, IL-4-et és dexamethasone-t a 3. napon az etetésekkel pótoltuk.

3.5 A dendritikus sejt felülűszók (moDS, IFN DS, dexta DS) összegyűjtése

A differenciáltatás 5. napján a DS-eket CL075-tel (1 µg/ml, Sigma) vagy LPS-dal (0.5 µg/ml, InvivoGen) kezeltük 30 percen keresztül. A TLR ligandumok eltávolítása érdekében háromszor mostuk a sejteket (RPMI 1640), majd 4.0×10^6 sejt/ml DS-et 2, 8 vagy 24 óráig inkubáltuk szérum-mentes RPMI 1640 médiumban. A DS-ek által termelt felülűszókat (moDS, IFN DS, dexta DS) 9500 relatív centrifugálási erő (rcf)/perc sebességgel 10 percig 4 °C-on centrifugálva gyűjtöttük össze.

3.6 Humán monociták differenciáltatása érett dendritikus sejtekké

A differenciáltatás 5. napján a DS-eket 100 ng/ml LPS-dal kezeltük. 24 óra múlva az LPS-előkezelt DS-eket (LPS-DS) TLR-ligandumokkal kondicionáltuk 30 percen keresztül, majd három mosási lépést követően 4.0×10^6 sejt/ml DS-et 2 óráig inkubáltuk szérum-mentes RPMI 1640 médiumban. A DS-ek által termelt felülűszót 9500 rcf/perc sebességgel 10 percig 4 °C-on centrifugálva gyűjtöttük össze.

3.7 Humán monociták differenciáltatása makrofágokká

Az izolált monociták 50 ng/ml Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF, PeproTech) jelenlétében 5 nap alatt (37 °C, 5%, CO₂) nyugvó, M0 típusú makrofágokká differenciálódtak szérummentes AIM-V médiumban 2.0×10^6 sejt/ml sejtsűrűségben 6 lyukú szövettenyésztő lemezen. A differenciáltatáshoz szükséges M-CSF-et a 2. és az 5. napon az etetésekkel pótoltuk.

Az M1 és M2 altípusok létrehozásához a sejteket a differenciáltatás 5. napján 24 órán keresztül stimuláltuk (50 ng/ml LPS-dal (InvivoGen), IFN γ -val (20 ng/ml, PeproTech) az M1 fenotípus, illetve IL-4-gyel (20 ng/ml, PeproTech), IL-10-zel (20 ng/ml, PeproTech) és TGF β -val (20 ng/ml, PeproTech) az M2 fenotípus kialakításához. A sejteket a 6. napon tekintettük M1 és M2 típusú makrofágoknak. A TAM-szerű sejtek differenciáltatásához az izolált monocitákat 5 napig 6 lyukú szövettenyésztő lemezen tartottuk 2.0×10^6 sejt/ml sejtsűrűségben, THP-1 sejtvonal felülűszójában, melyet IL-4-gyel (20 ng/ml), IL-10-zel (20 ng/ml) és TGF β -val (20 ng/ml) egészítettünk ki. Az 5. napon a TAM-szerű sejteket ismét THP-1 felülűszóval kezeltük 24 órán át. A makrofágokat a 6. napon tekintettük TAM-szerű sejtekké.

3.8 Felhasznált sejtvonalak

Az SVT35 Jurkat és HT-29 sejtvonalakat RPMI 1640 médiumban, 10% FCS (Gibco), 2 mM L-glutamine (Biosera) és 40 mg/l Gentamicin (Sigma-Aldrich) jelenlétében tenyésztettük (37 °C, 5%, CO₂).

A THP-1 sejtvonalat szérummentes AIM-V médiumban tenyésztettük (37 °C, 5%, CO₂).

A HUVECs sejteket 20% FCS, 2 mM L-glutamin, 1% penicillin/streptomycin (Gibco), EGMTM-2 Endothelial Single QuotsTM Kit (Lonza)-tartalmú M199 (Gibco) médiumban tenyésztettük (37 °C, 5%, CO₂).

3.9 A THP-1 felülúszó előállítás

A THP-1 felülúszó előállításához a sejteket 2 napig, 2.0×10^5 sejt/ml sűrűséggel tenyésztettük szérummentes AIM-V tápközegben (Thermo Fischer Scientific), majd a felülúszót 2000 rcf/perc sebességgel 5 percig tartó centrifugálást követően gyűjtöttük össze.

3.10 Az M1 és M2 makrofágok ko-kultúrában való tenyésztése

Az M1 és M2 makrofágok eltérő sejthalál érzékenységet ko-kultúrában teszteltük. A következő ko-kultúrákat hoztuk létre:

Mosási lépéseket követően az egyenlő számú M1 és M2 makrofágot (4.0×10^5 sejt/0.5 ml) együtt tenyésztettünk 4 órán át 24-lyukú sejtenyésztő lemezen. Az M1 és M2 ko-kultúrát nekroptotikus stimulusokkal kezeltük. A sejthalál indukciót követően 24 órával a túlélő makrofágokat anti-CD209-Phycoerythrin (CD209-PE) és anti-CD80-Fluorescein isothiocyanate (CD80-FITC) antitestekkel jelöltük.

Az M1 és az M2 sejthalál megkülönböztetése érdekében az M2 makrofágokat CellTrackerTM Green CMFDA festékkel (10 ng/ml, Thermo Fischer Scientific) töltöttük fel 37 °C-on 30 percig. Három intenzív mosási lépést követően 4.0×10^5 sejt/0.5 ml M2 sejtet tenyésztettünk, azonos koncentrációjú, nem jelölt M1 makrofággal, 24-lyukú sejtenyésztő lemezeken. Az M1 és M2 ko-kultúrát nekroptotikus ingerekkel kezeltük, az eltérő populációk sejthalálát 24 óra elteltével PI festéssel határoztuk meg.

3.11 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), „szendvics” ELISA

Az M1 és M2 makrofágok felülúszóit a differenciáltatás 6. napján gyűjtöttük össze és mértük ELISA módszerrel. A DS-eket a differenciáltatás 5. napján gyűjtöttük össze és mértük ELISA módszerrel. A citokin koncentrációk meghatározásához TNF α , IL-6, IL-10, IL-12p70 OptEIA kitéket használtunk a gyártó utasításai szerint (BD Biosciences).

3.12 Kaszpáz-3/7 enzimaktivitás mérése

Az SVT35 Jurkat sejteket a moDS-ek felülúszóival vagy 20 ng/ml TNF α jelenlétében inkubáltuk 24 órán keresztül, 37 °C-on. A kaszpáz 3/7 aktivitást az Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 assay kit (Promega) használatával mértük, követve a gyártó utasításait.

3.13 Immunprecipitáció

Az SVT35 Jurkat sejteket a moDS-ek felülúszóival vagy TNF α és SMAC mimetikum (Birinapant) jelenlétében inkubáltuk 1 órán keresztül (37 °C), majd a sejteket 1 % Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) és 1 % proteáz-gátló koktél (Sigma-Aldrich) tartalmú lízis pufferben szuszpendáltuk és 30 percen keresztül inkubáltuk (4 °C). A sejt-lizátumot centrifugálást követően gyűjtöttük össze (12.350 rcf, 10 perc, 4 °C), majd anti-kaspáz-8 antitesttel fedett Protein G gyöngyökkel kevertettük (GE Healthcare) (*overnight*, 4 °C). A következő napon négyszer (lízis puffer) mostuk a gyöngyöket, majd 2X Laemli pufferben szuszpendáltuk fel. A fehérje mintákat linearizáltuk (5 perc, 95 °C), majd SDS-PAGE gélen futattuk a mintákat. A RIPK-1-kaspáz-8 interakciót anti-RIPK1 western blottal mutattuk ki. Az interakció kialakulását anti-RIPK1 antitesttel fedett Protein G gyöngyökkel történt immunprecipitációt követő anti-kaspáz-8 western blottal is megerősítettük.

3.14 Áramlási citometria

A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel mértük, az adatok kiértékelését pedig FlowJo szoftverrel (Tree Star) végeztük.

3.14.1 Sejtfelszíni molekulák megjelenésének vizsgálata

A következő sejtfelszíni jelöléseket mértük: CD209-PE (DC-SIGN, BioLegend), CD206-phycoerythrin cyanine TM5 (Pe-CyTM5, BD Pharmingen), CD80-FITC (SONY Biotechnology),

CD14-PE (BioLegend), HLA-DR-peridinin-chlorophyll-protein (PercP, BD Pharmingen), PD-1/CD279-PercP (BioLegend), CD163-PE (Biosciences).

A különböző specificitású ellenanyagokkal történő jelölés minden esetben a következő módon történt: a sejt pallethez hozzáadtuk a direkt jelölt ellenanyagot, majd 20 percig, 4 °C-on, sötétben inkubáltuk. Ezt követően FACS pufferrel mostuk a sejteket (5 perc, 1500 rpm, 4 °C). A sejtfelszíni fehérje expressziót 10000 darab sejten mértük le.

3.14.2 Sejthalál mérés

3.14.2.1 Sub-G1 mérés

A DNS fragmentációt sub-G1 mérés alapján határoztuk meg. A sejteket az aktivációt követően 70 %-os alkoholban fixáltuk 4 °C-on, 1 órán keresztül, majd citrát pufferrel (38 mM, pH 7.4) mostuk. A sejteket 50 µg/ml propidium-jodidot (PI, Sigma-Aldrich) tartalmazó citrát pufferben jelöltük 15 percen keresztül 37 °C-on.

3.14.2.2 Membrán integritás mérés

A sejthalált a membránintegritás elvesztése és a PI felvétele alapján is számszerűsítettük. A sejteket PI oldattal (10 µg/ml PI foszfát pufferben) festettük.

3.15 Western blot

A fehérjék kiszabadítását a sejtekből 2X Laemli pufferben való lizálással értük el. A fehérjéket 10% poliakril-amid gélen, SDS gélelektroforézissel választottuk el, a fehérje mintákat a méret szerinti szeparálást követően nitrocellulóz membránra vittük át (Bio-Rad Laboratories). Az antitestek nem specifikus kötődését 5%-os tejpor oldattal (TBS-Tween-ben oldva) gátoltuk meg. A blokkolást követően a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk *overnight* 4 °C-on 1000x hígításban alkalmazva: RIPK1 (BD Biosciences), RIPK3 (Cell Signaling), MLKL (Sigma-Aldrich), pMLKL (Cell Signaling), TAK1 (Cell Signaling), p38 (Thermo Fischer Scientific), pErk (Thermo Fischer Scientific), pJNK (Thermo Fischer Scientific), pIκβ (R&D Systems) és β-aktin (Sigma-Aldrich). Másodlagos ellenanyagként tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl (GE Healthcare), anti-egér (GE Healthcare) vagy patkányellenes (Sigma-Aldrich) antitesteket alkalmaztunk. A kialakult immunkomplexeket a SuperSignal™ West Pico

Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™) vagy SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™) felhasználásával tettük láthatóvá.

3.16 Statisztika

Valamennyi ábra legalább három, egymástól független donorból származó eredmény átlagait mutatja \pm standard szórással (SD). Az eredmények statisztikai elemzése során adott esetben egyutas vagy kétutas varianciaanalízist alkalmaztunk Sidak teszttel, Graphpad Prism 6.00 program segítségével (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4. Eredmények

A doktori munka első fázisában összehasonlítottuk a humán monocita-eredetű M1 és M2 makrofágok nekroptózisra való érzékenységét.

4.1 Az M1 makrofágokkal ellentétben, az M2 sejtek érzékenyek a TAK1 gátló által kiváltott nekroptózisra

Annak igazolására, hogy a sejtpopulációk elérték a megfelelő M1 és M2 fenotípusokat, vizsgáltuk a polarizált makrofágok sejt felszíni markereinek megjelenését. Az M1 sejteken megfigyeltük a CD80 (M1 marker) indukcióját, valamint az M2 sejteken a CD206 és CD209 (M2 markerek) magasabb expressziós szintjét.

A két makrofág alpopuláció funkcionális jellemzéseként mértük az IL-10 és IL-12 citokinek termelését. A szakirodalmi adatoknak megfelelően az M1 sejtek szignifikánsan nagyobb mennyiségben termeltek IL-12 citokint, mint az M2 sejtek, miközben az M2 sejtekben jelentősebb mennyiségű IL-10 volt kimutatható.

Összehasonlítottuk a makrofág alpopulációk érzékenységét apoptotikus, illetve nekroptotikus sejthalál indukcióra. A két sejttípus ugyanolyan érzékeny volt az általunk vizsgált ingerek többségére, a TAK1 inhibitor azonban Z-VAD jelenlétében intenzívebb sejthalált indukált az M2 sejtekben. Ennek az eredménynek a megerősítéseként megvizsgáltuk a Birinapant és az 5Z-7-mediált sejthalál dózisfüggését. Kaszpáz gátló jelenlétében, az általunk vizsgált koncentrációkban az 5Z-7 által kiváltott sejthalál intenzívebb volt az M2 sejtekben, mint az M1 makrofágokban. A Birinapant kezelés azonban Z-VAD kezelés mellett sem eredményezett

magasabb sejthalál-intenzitást az M2 makrofágokban. A Birinapant által kiváltott sejthalál nem szignifikáns mértékben, de enyhén intenzívebb volt az M1 sejtekben.

Specifikus inhibitorok jelenlétében is elvégeztük a kísérleteket. Ehhez előzetesen RIPK3 inhibitorral (GSK'872), illetve RIPK1 inhibitorral (Necrostatin-1, Nec-1) kezeltük a polarizált makrofágokat. Mindkét gátlószer blokkolta a BZ által indukált sejthalált, illetve M2 sejtekben a GSK'872 és a Nec-1 is egyaránt gátolta az OZ által indukált citotoxicitást, igazolva, hogy a megfigyelt sejthalál nekroptózis.

A nekroptózis jellegzetes markereként megvizsgáltuk az MLKL (S358) foszforiláció (p-MLKL) kialakulását a makrofág típusokban a BZ és az OZ reagensekkel való aktiválás után. A BZ kezelés hatására kimutattuk az MLKL foszforilációját mind az M1, mind az M2 sejtekben, de az OZ stimulációt követően p-MLKL csak az M2 makrofágokban jelent meg.

Felmerült a kérdés, hogy a funkcionálisan is eltérő M1 és M2 makrofágok autokrin TNF α termelése állhat-e a két populáció eltérő sejthalál érzékenységének hátterében. Ennek a vizsgálatához szolubilis TNFR-ral (TNF:Fc fehérjével) kezeltük elő a polarizált makrofágokat, majd ezt követően váltottuk ki a sejthalált az OZ vagy BZ kezelésekkkel. Eredményeink azt mutatják, hogy a TNF:Fc csak részlegesen gátolta az OZ által indukált nekroptózist. Ez alapján azt feltételezzük, hogy az autokrin TNF α termelés mellett más mechanizmusok is szerepet játszhatnak az OZ/BZ mediált sejthalálban.

4.2 Az M1 és M2 sejtek ko-kultúrában való tenyésztése nem érzékenyíti az M1 sejteket a TAK1 inhibitor által indukált nekroptózisra

Az M1 és M2 makrofág alpopulációk a krónikus gyulladás helyén vagy a daganatok mikro környezetében egyszerre vannak jelen. Vizsgáltuk a makrofágok azon képességét, hogy az M1 és M2 sejtek együttes jelenléte módosítja-e az egyes altípusok érzékenységét nekroptotikus stimulusokra. Ennek megállapítására, az M2 makrofágokat CellTracker™ Green CMFDA festékkel töltöttük fel, majd M1 makrofágokkal helyeztük ko-kultúrába. Az együtt tenyésztett sejteket BZ vagy OZ reagensekkel kezeltük 24 órán keresztül. A sejthalál intenzitását mind a CellTracker pozitív, mind negatív populációkban meghatároztuk PI festéssel. A külön kezelt makrofágok esetében megfigyelt eredményekkel összhangban, az M2 sejtek érzékenyek voltak az OZ által kiváltott nekroptózisra, míg az M1 sejtek rezisztensek maradtak ezzel szemben. Továbbá az eddigi eredményeknek megfelelően a BZ kezelés mindkét makrofág populációt elpusztította a ko-kultúrában.

Ezt az eredményt a túlélő sejtpopulációk sejtfelszíni markereinek mérésével erősítettük meg, melyet a sejthalál indukciója előtt és után is elvégeztünk. Az OZ kezelés csökkentette a CD209⁺ sejtek mennyiségét, tehát az M1/M2 ko-kultúra összetételét az M1 túlsúly felé tolta el, miközben a BZ kezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást az M1/M2 arányra.

Eredményeink szerint az együtt tenyésztett M1 és M2 makrofágok TAK1 inhibitorral történő kezelése a túlélő sejtek egyensúlyát az M1 dominancia felé tolta el.

4.3 A TAK1 jelátviteli út downstream komponenseinek gátlása nekroptózist vált ki az M2 sejtekben

Kísérleteink során a TAK1 által szabályozott útvonalakat a következő inhibitorokkal gátoltuk: SP600125 (JNK inhibitor), SB203508 (p38MAPK inhibitor), U0126 (ERK inhibitor) és TPCA1 (IKK inhibitor). Kaszpáz gátló jelenlétében az általunk használt inhibitorok sejthalált indukáltak az M2 makrofágokban. A vizsgált dózisokban a kiváltott sejthalál az M2 sejtekben intenzívebbnek bizonyult, mint az M1 sejtekben. A p38 kináz inhibitor kivételével, minden vizsgált esetben szignifikánsnak bizonyultak (JNK inhibitor, ERK inhibitor, I κ B inhibitor) a sejthalál intenzitásában megfigyelhető különbségek. A MAPK és NF κ B inhibitorainak különbözően kombinált alkalmazása szintén intenzívebb sejthalált indukált az M2, mint az M1 makrofágokban. Azonban a kaszpáz aktivitás (Z-VAD hiányában) mindkét makrofág alpopulációt megvédte akár a MAPK, akár az IKK gátlás hatására kiváltott nekroptózistól.

Vizsgáltuk az M1 és M2 sejtekben az ERK, JNK, p38 és I κ B foszforilációs szintjét phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) kezelés hatására. A PMA-aktivált makrofágokban hasonló intenzitású MAPK és I κ B foszforiláció mutatható ki.

Ezt követően megvizsgáltuk az M1 és M2 makrofágokban a nekroszóma komponensek fehérje expresszióját. A nekroptózis szabályozásában szerepet játszó legfontosabb fehérjék expressziós szintjében sem találtunk jelentős különbséget az M1 és M2 sejtek között.

4.4 A TAM-szerű makrofágok érzékenyek a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózisra

Az M2-szerű funkcionális tulajdonságokkal jellemezhető tumor asszociált makrofágok sejthalál érzékenysége meghatározó lehet azon terápiákban, ahol a tumorok mikro környezetében nekroptózis indukáló szereket alkalmaznak. A TAM-ok nekroptózis érzékenységének vizsgálatához *in vitro* monocita-eredetű TAM-szerű sejteket differenciáltattunk és az életképességüket összevetettük az M1 és M2 makrofágokkal. Az általunk differenciáltatott TAM-

ok a szakirodalmi adatoknak megfelelően magas CD206, CD163, HLA-DR és alacsony CD14 és PD-1 expressziót mutattak.

A TAM-szerű sejteken Birinapant/Z-VAD vagy 5Z-7/Z-VAD hozzáadásával indukáltunk nekroptózist. Megállapítottuk, hogy a TAM-szerű sejtek ugyanolyan érzékenyek a BZ-indukált nekroptózisra, mint az M1 sejtek. Azonban az M2 sejtekhez hasonlóan szignifikánsan nagyobb sejthalált mutatnak az 5Z-7/Z-VAD kezelés hatására, mint az M1 makrofágok.

Megfigyeléseinket összefoglalva, az M2 sejtek bármelyik túlélési jel hiányában nekroptózissal elpusztulnak kaspáz gátló jelenlétében, míg az M1 makrofágok további túlélési jeleket használhatnak, mely megakadályozhatja a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózist.

A TAM-szerű makrofágok, hasonlóan az M2 sejtekhez szignifikánsan nagyobb érzékenységet mutatnak az OZ nekroptózis indukció hatására, mint az M1 makrofágok. Ez a tulajdonságuk terápiás lehetőséget nyújthat a tumorok környezetében megjelenő tolerogén hatású sejtek eliminációjára.

A doktori munka második fázisa során azt vizsgáltuk, hogy a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) citotoxikus képessége hogyan változik meg PRR-stimulusok hatására.

4.5 A moDS-ek felülűszója sejthalált indukál

A DS-ek citotoxikus képességének vizsgálatához humán moDS-eket használtunk. A moDS-eket LPS (TLR4) és CL075 (TLR7-8) TLR-ligandumokkal kezeltük 30 percen keresztül, majd intenzív mosási lépéseket követően további 2 órán át inkubáltuk. Ezt követően a DS-ek felülűszóival kezeltük az SVT35 Jurkat célsejteket 24 órán keresztül. Az LPS-dal vagy CL075-tel aktivált DS-ek felülűszója jelentős mértékű sejthalált eredményezett a Jurkat sejteken. Ezzel szemben azon DS-ek felülűszója -amelyet nem stimuláltunk TLR-ligandummal- sejttölő hatást nem mutatott. Ezeket az eredményeket a subG1 csúcs és kaspáz 3/7 aktivitás mérésekkel támasztottuk alá.

Annak vizsgálatára, hogy az általunk létrehozott felülűszók sejtpusztító hatása érvényesül-e más sejtek esetében is, a citotoxikus hatást a HT-29 vastagbél-eredetű adenokarcinóma sejtvonalon és primer HUVEC-s sejteken is teszteltük. A HT-29 és HUVEC-s sejtekhez DS felülűszót adtuk, majd 24 óra múlva mértük a sejthalál intenzitást. Eredményeink alapján elmondható, hogy a DS citotoxikus funkciója nem T-sejt/Jurkat szelektív, mivel a HT-29

és HUVECs sejtek is szignifikáns mértékben elpusztultak az LPS vagy CL075-kezelt DS felülúszó hatására.

Vizsgáltuk, hogy a DS-ek hogyan reagálnak a citotoxikus hatású felülúszóra, mind saját, mind pedig eltérő donorokból származó moDS felülúszó esetében. Az eredményeink szerint maguk a DS-ek rezisztensnek bizonyultak a citotoxikus képességgel szemben.

Következő lépésként megvizsgáltuk, hogy a DS felülúszó citotoxikus képessége a szövetekben lokalizált, éretlen DS fenotípushoz köthető-e, vagy inkább a nyirokcsomókba vándorolt, érett DS-ek jellemzője. Ennek megállapításához LPS-dal 24 óráig aktiváltuk a DS-eket (LPS-DS), majd az LPS előkezelt és kezeletlen moDS-eket egyaránt 30 percig aktiváltuk LPS-dal vagy CL075-tel. Összehasonlítottuk az így nyert felülúszók citotoxikus hatását. Eredményeink szerint a Jurkat sejtek szignifikánsan kisebb mértékben pusztultak el az LPS-DS felülúszó adásakor, mind az LPS, mind pedig a CL075-aktivációt követően.

4.6 A moDS-ek felülúszója TNF α -függő sejthalált vált ki

A moDS-eket LPS és CL075 TLR-ligandumokkal kezeltük 30 percen keresztül, majd intenzív mosási lépéseket követően 2, 8 vagy 24 óráig inkubáltuk. A moDS felülúszókat szolubilis TNF, Fas vagy TRAIL receptorokkal kezeltük elő, hogy semlegesítsék az esetleges sejthalál ligandumokat a felülúszóban. Az SVT35 Jurkat sejtekhez TNF:Fc, Fas:Fc és TRAIL:Fc fehérjével előkezelt DS felülúszókat adtuk és 24 óra múlva mértük a sejthalált. A TNF:Fc megakadályozta a célsejtek halálát, megerősítve ezzel a TNF α DS citotoxicitásában betöltött nélkülözhetetlen szerepét. Azonban a FasL vagy a TRAIL elleni specifikus inhibitorok nem gátolták meg a moDS által kiváltott sejtpusztulást, függetlenül attól, hogy 2, 8 vagy pedig 24 órás felülúszót adtunk a sejtekhez.

Az eredményeink megerősítéséhez mértük a TLR aktivált DS felülúszókban a TNF α mennyiségét. Az LPS és CL075-kezelt DS felülúszó 200-400 pg/ml TNF α -t tartalmaz.

4.7 A DS felülúszó RIPK1-függő sejthalált indukál

Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy a RIPK1 részt vesz-e a DS felülúszó által mediált sejthalálban. Ennek megállapításához az SVT35 vad típusú Jurkat sejtekkel és RIPK1-/- klónjának DS felülúszóra való érzékenységet teszteltünk. Ennek első lépéseként western blot módszerrel megerősítettük a fehérje hiányát a RIPK1-/- sejtvonalban. A sejthalál mérés alapján

elmondható, hogy a TLR-kezelt DS felülűszó adása szignifikánsan nagyobb mértékű sejtpusztulást váltott ki a RIPK1^{+/+} vad típusú sejteken, mint a RIPK1 negatív sejtvonalon.

Megvizsgáltuk, hogyan reagál rekombináns sejthalál ligandumokra az SVT35 vad típusú Jurkat sejtvonal és ennek RIPK1^{-/-} változata. Eredményeink szerint vad típusú Jurkat sejtek és RIPK1^{-/-} klónja a TNF α , FasL és TRAIL sejthalál ligandumokra egyaránt érzékenyek, ebből következően nem a vad típusú, illetve RIPK1 deficiens sejtvonalak eltérő TNF érzékenysége okozta a sejtpusztulásban megfigyelt különbségeket.

Vizsgáltuk, hogy a DS felülűszó hatására kialakul-e a kísérleti rendszerünkben a RIPK1 és kaszpáz-8 kapcsolat. Ehhez RIPK1 és kaszpáz-8 immunprecipitációkat végeztünk. Eredményeink alapján a kaszpáz-8 a RIPK1 kinázhoz kapcsolódik a TLR-ligandumokkal kezelt DS felülűszó hatására, ami a kezeletlen moDS felülűszónál nem mutatható ki.

Vizsgáltuk a RIPK1 foszforilációs állapotát a DS felülűszó kezelést követően a Jurkat sejtekben. Az LPS-dal és CL075-tel kezelt DS-ek felülűszója kiváltotta a RIPK1 foszforilációját, ami az moDS kezelt Jurkat sejtekben nem mutatható ki. Ezek az eredményeink arra utalnak, hogy a RIPK1 által közvetített szignálok legalább részben felelősek a DS felülűszó által indukált sejthalálért.

4.8 A DS felülűszó apoptózist indukál

Annak megállapítására, hogy a DS felülűszó által indukált sejtpusztulás apoptózisnak vagy nekroptózisnak tekinthető, különböző inhibitorokat alkalmaztunk. A Jurkat célsejtek 10 μ M Z-VAD-dal történő előkezelése meggátolta a DS felülűszó-indukált sejthalált a subG1 mérés alapján. Továbbá a Z-VAD előkezelés megszüntette a Jurkat sejt pusztulást a PI-felvétel szerint meghatározott sejthalál esetében is. A Necrostatin-1 azonban nem akadályozta meg a DS citotoxicitást sem a subG1, sem pedig a PI mérések alapján.

4.9 A tolerogén mikrokönyezet csökkenti a DS-ek citotoxikus képességét

Annak megállapítására, hogy az elpusztuló sejtekből származó antigének hozzáférhetőségét módosítja-e szöveti környezet, megvizsgáltuk a tolerogén és immunogén körülmények között differenciáltatott DS-ek funkcióit. A tolerogén mikrokönyezeti feltételeket a DS-ek dexamethasone (dexa DS), míg az intracelluláris fertőzést az I-es típusú interferon (IFN DS) jelenlétében történő differenciáltatással modelleztük. A megfelelő polarizációs állapot

igazolásához vizsgáltuk az egyes DS populációkban LPS vagy CL075 aktiválást követően a gyulladáshoz, illetve tolerogén citokinek termelését. Az IFN-nal kezelt DS szignifikánsan nagyobb mennyiségű IL-6 citokint bocsátott ki, mint a tolerogén populáció, míg az IL-10 termelés a dexamethasonnal kezelt DS-ekben volt jelentősebb.

Vizsgáltuk, hogy az IFN vagy dexamethasone jelenlétében differenciált DS-ek felülűszóinak citotoxikus hatása módosul-e az moDS populációkhoz viszonyítva. Ennek megállapítására az eltérő körülmények között differenciált DS populációkat LPS-dal vagy CL075-tel stimuláltuk, majd a Jurkat sejteket LPS vagy CL075-stimulált IFN DS, dexamethasonnal és moDS felülűszókkal kezeltük. A felülűszók által kiváltott sejthalál nem változott szignifikáns mértékben az IFN DS esetében, azonban a tolerogén dexamethasonnal kezelt DS felülűszó szignifikánsan kisebb sejtpusztulást váltott ki a célsejteken.

Annak meghatározására, hogy az immunmoduláló környezet befolyásolhatja-e a célsejtek érzékenységét, a Jurkat sejteket előkezeltük I. típusú interferonnal vagy tolerogén hatású IL-10 és/vagy TGF β citokinekkel. Az előkezeléstől függetlenül a DS felülűszók hasonló sejthalált váltottak ki a Jurkat sejtekben. Az IFN előkezelés kis mértékben, de nem szignifikánsan nagyobb sejthalált okozott a célsejteken.

Ezek a megfigyelések összességében arra utalnak, hogy a PRR stimulációval kiváltott TNF termelés felelős az moDS-közvetített citotoxicitásért, amely legalább részben RIPK1 által közvetített apoptózis. Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a tolerogén mikrokörnyezet csökkenti a DS-indukált citotoxicitás mértékét. Ez a hatás a DS-mediált sejttörlésen keresztül valósul meg, a target sejtek érzékenységét nem módosítja.

5. Megbeszélés

A veleszületett immunrendszer szervezetünk első védelmi vonala. A legfőbb sejtes alkotói a makrofágok és a DS-ek, melyek elsőként érzékelik a bejutó kórokozókat és azonnali reakciójukkal biztosítják a korai védelmi mechanizmusok lezajlását. Működésük során a konzervált, molekuláris mintázatokat ismerik fel, amelyek számos kórokozóban megtalálhatóak. A PAMP-ok felismerését követően a védekező sejtekben intracelluláris jelátviteli kaszkád indul el. Ennek célja egy azonnali, általános, pro-inflammatórikus válasz generálása, végső soron pedig a kórokozók eliminálása. A veleszületett immunsejtek a PRR-okon keresztül a környezeti és endogén veszély jelek széles skáláját képesek felismerni. Ezáltal nem csak a patogénekből származó PAMP-okat, de a saját sejtek károsodására utaló, endogén szignálokat, DAMP-okat is érzékelhetnek. A PRR-ok mind a PAMP, mind pedig a DAMP stimulust követően jelentős fenotípusos és funkcionális változást indítanak el a természetes immunrendszer sejtjeiben, amelyek ez által aktivált állapotba kerülnek.

Az immunrendszer aktivációja és a sejthalál folyamatok több ponton összekapcsolódnak. A sejthalál típusok immunrendszerre gyakorolt hatása attól függ, hogy milyen eredményesen tárnak fel veszély jeleket, illetve antigéneket az elpusztuló sejtekből. Az antigének mellett felszabaduló DAMP-ok a PRR-okhoz kötődve olyan génexpressziós változásokat indítanak el, amelyek a veleszületett immunsejtek fagocitáló képességét és a sejtfelszíni MHC és kostimulátor molekulák kifejezését fokozzák. Ezáltal a veleszületett immunsejtek olyan módon aktiválódnak, hogy gyulladást, illetve az elpusztuló sejtekből származó antigénekre specifikus T sejtek aktivációját indítják el. A sejthalál és az immunrendszer aktivációjának kapcsolata kedvező és előnytelen következményekkel is járhat. A gyulladási reakció generálásával egyrészt a sérülés helyére jutnak a veleszületett immunrendszer védekező sejtjei és az adaptív immunrendszer számára jelzik azt a lehetséges problémát, amely a sejthalálhoz vezetett. Másrészt az immunválasz beindítása olyan gyulladási mediátorok felszabadításával jár együtt, amelyek szöveti sérüléseket okoznak.

A makrofágok két polarizációs állapota ismert, a klasszikusan aktivált M1 és alternatív módon aktivált M2 makrofágok csoportja. A két alpopulációra jellemző, hogy különböző faktorokat termelnek, eltérő biológiai funkciókkal és sejtfelszíni markerekkel rendelkeznek. Az M1/M2 átmenet célzott szabályozása ígéretes stratégiát jelent a különböző betegségek gyógyításában. A jelenleg folyamatban lévő klinikai vizsgálatok célja az M1 és M2 makrofágok arányának módosítása például daganatos megbetegedések, atherosclerosis, sclerosis multiplex és

endometriózis esetében. Az alkalmazott terápiák egyrészt a sejtek differenciálódásának szabályozását, másrészt a már polarizálódott sejtek funkciójának megváltoztatását célozzák meg. A különböző makrofág populációk szelektív elpusztítása kézenfekvő terápiás lehetőséget nyújthat az M1-M2 arány módosítására. A sejthalál terápiás indukciójánál azonban figyelembe kell venni, hogy a makrofágok rezisztensek a legtöbb apoptotikus stimulusra, de kifejezetten érzékenyek a szabályozott sejthalál újonnan megismert gyulladáshoz vezető formáival, mint például a nekroptózissal szemben.

Kutatómunkánk során összehasonlítottuk az M1 és M2 sejtek érzékenységét különböző sejthalál stimulusokkal szemben. A kísérletek során humán monocita-eredetű M1 és M2 makrofágokat használtunk, amely alpopulációk hasonló érzékenységet mutattak a vizsgált apoptotikus vagy nekroptotikus indukciók többségére. Az utóbbi kiváltására két, szakirodalomban elfogadott nekroptózist indukáló kezelést alkalmaztunk. Az apoptózisgátló fehérjék antagonistái blokkolják a RIPK1 ubiquitinációt, míg a TAK1 gátlók megakadályozzák a RIPK1 foszforilációját. Kaszpáz gátló jelenlétében alkalmazva mindkét szer kiválthatja a nekroptózist makrofágokban is. Abban az esetben, amikor TAK1 inhibitor kezeléssel indukáltunk sejthalált, azt figyeltük meg, hogy az M2 sejtek érzékenyebbek a nekroptózisra, mint az M1 sejtek. A klasszikus nekroptózisnak megfelelően a RIPK3 és a RIPK1 inhibitor adása megakadályozta a kiváltott sejthalált.

Mivel a TAM-ok általában hasonló funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek, mint az M2 makrofágok, felmerült a kérdés, hogy ezekben a sejtpopulációkban hasonló sejthalál útvonalak mennek-e végbe, mint az alternatívan aktivált makrofágok esetében. *In vitro* TAM-szerű sejteket differenciáltattunk THP1-felülűző és M2-polarizáló citokinek (IL-4, IL-10, TGF β) jelenlétében és vizsgáltuk a sejtek nekroptózisra való érzékenységét. Kimutattuk, hogy a TAM-szerű sejtek, mint az M2 makrofágok, egyaránt érzékenyek a TAK1 gátló jelenlétében indukált nekroptózisra. Az M1 és M2 makrofág alpopulációk a krónikus gyulladás helyén vagy a daganatok mikro környezetében egyszerre fordulnak elő. Ezáltal felmerült a kérdés, hogy az M1 és M2 sejtek együttes tenyésztése módosítja-e sejthalálra való érzékenységüket. Ennek vizsgálatára a TAK1 inhibitorral kezelt M1 és M2 sejteket ko-kultúrában tenyésztettük. A TAK1 gátló jelenlétében indukált sejthalálra az M2 sejtek érzékenyebbek voltak az együtt tenyésztett makrofág populációk kezelése során is. Az inhibitor a két sejtpopuláció egyensúlyát az M1 dominancia irányába tolta el. Ez kizárja annak a lehetőséget is, hogy a sejthalálban mutatott

különbséget az M2 által termelt autokrin citotoxikus, vagy az M1 által termelt túlélő faktor okozza. Ez az eredmény a TAK1 gátló tumor terápiában való használatát indokolja - szemben a SMAC mimetikumok alkalmazásával – azáltal, hogy kiváltja mind az M1-M2, mind a TAM-szerű sejtek nekroptózist. Azonban a nekroptózis indukáló szerek terápiás alkalmazásához további vizsgálatok elvégzése szükséges annak ellenőrzésére, hogy milyen hatással van a kiváltott sejthalál a szöveti mikrokörnyezet egyéb sejtípusaira. Feltételezésünk szerint a sejthalállal szemben mutatott nagyobb rezisztencia arra utalhat, hogy az M1 makrofágokban működhet egy speciális túlélő jel, amely felülírja a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózist.

Megállapításaink szerint legalább két, különféle nekroptotikus útvonal működik a makrofágokban. Ez a megfigyelés hangsúlyozza annak a fontosságát, hogy a nekroptotikus útvonalak további vizsgálata és specifikusabb megismerése szükséges. A doktori munka során olyan körülményeket azonosítottunk, amikor az M1 vagy M2 makrofágok sejthalálra való hajlamuk eltérő, ezáltal alkalmas a makrofág arányok szabályozására. Eredményeink új megközelítést jelentenek olyan kórképekben, ahol az M1 és M2 makrofágok aránya befolyásolhatja a betegség alakulását, így tumorok, krónikus gyulladással megbetegedések, illetve krónikus fertőzések kezelésében.

A doktori munka során vizsgáltuk, hogy a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) citotoxikus képessége hogyan változik meg a PRR-stimulusok hatására.

A DS-ek biztosítják az immunrendszer két működési egysége, az öröklött és az adaptív immunrendszer közötti kapcsolatot. A szövetek között folyamatosan vándorló DS-ek a környezetükben elhalt, fertőzött vagy tumoros sejtekből származó antigéneket fagocitálják, majd alternatív módon keresztprezentálhatják. Ezáltal lehetővé teszik az az intracelluláris kórokozókra vagy tumoros sejtekből származó antigénekre specifikus CD8⁺ naiv T sejtek aktiválását. Az intracelluláris antigének keresztprezentálása az nélkülözhetetlen a naiv citotoxikus T sejt aktivációhoz, amely folyamat a leghatékonyabban az antigéneket tartalmazó sejtek immunogén sejthalálát követően valósul meg.

A sejthalál immunológiai kimenetele az alábbiak szerint osztályozható: (1) tolerogén, elsősorban apoptózist követően, (2) gyulladást kiváltó (nekrózis vagy nekroptózis) és (3) a RIPK1-függő immunogén sejthalál kimenetek, amelyek előnyösek lehet, azáltal, hogy növeli a keresztprezentáció kialakulásának valószínűségét.

A fagocitózis és az antigén prezentáció mellett a DS-ek újonnan megismert funkciója a citotoxicitás, amelynek immunológiai szerepe még nem teljesen tisztázott. Mivel DS-ek aktivációt követően a fertőzés helyéről rövid időn belül a nyirokcsomókba vándorolnak, így nagy mennyiségű fertőzött vagy tumoros sejt elpusztítására nem képesek. Ezek alapján azt feltételeztük, hogy a DS-ek sejtölő tulajdonsága nem a klasszikus értelemben vett - T és NK sejtekre jellemző - citotoxikus, a patogének eliminálását célzó effektor funkció. Hipotézisünk szerint a DS-ek sejtpusztító képessége arra szolgál, hogy környező sejtek fagocitózisát lehetővé tegye, hozzáférhetővé váljanak az intracelluláris antigének, olyan céllal, hogy azok keresztprezentációs útvonalon keresztül specifikus CD8⁺ T sejteket aktiváljanak. Ezt az elgondolást alátámasztja, hogy a szövetek között járórozó DS-ek citotoxikus és fagocita funkciója intenzívebb, mint az érett DS-eké.

A kísérletek elvégzése során humán mDS-eket használtunk, amelyekről feltételeztük, hogy a sejtpusztító képességüket patogének jelenléte/érzékelése váltja ki. Megfigyeltük, hogy a rövid ideig tartó, PRR ligandumokkal (LPS vagy CL075) kondicionált DS-ek felülűszója különböző célsejtekben (SVT35 Jurkat, HT-29, HUVECs) sejthalált indukál. Tehát a kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a DS citotoxicitás indukálásához rövid ideig tartó PRR aktiválásra van szükség. Ebből arra következtethetünk, hogy a DS citotoxicitás nem tekinthető konstitutív folyamatnak, fertőzés hiányában a DS-ek ilyen módon nem ellenőrzik a szöveti környezetet. Az LPS-dal hosszú ideig előaktivált DS-ekről összegyűjtött kondicionált felülűszó azonban kevésbé citotoxikus. Az aktiváció után 24 órával, mialatt a DS érése is lezajlik, a differenciálódott sejtek már kevésbé citotoxikusak. In vivo ezek a DS-ek már jellemzően elhagyják a perifériás szöveteket és a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, mint antigén prezentáló sejtek, így a fertőzések detektálása már nem feladatuk.

Feltételeztük, hogy a szöveti környezet is szabályozza a DS-ek citotoxikus tulajdonságát. A DS-ek keresztprezentáló képessége különösen az intracelluláris kórokozókból és a tumorokból származó antigénekre specifikus adaptív immunválasz beindításához nélkülözhetetlen. A DS-eket szabályozhatja a tumorok többségére jellemző immunszuppresszív hatás, illetve a fertőzött sejtek által termelt I. típusú interferonok érzékelése. Összehasonlítottuk a tolerogén stimulus, dexamethasone vagy az I. típusú interferon jelenlétében differenciálódott DS-ek citotoxikus képességét. A dexamethasone-t is tartalmazó tápfolyadékban fejlődött DS-ek kisebb mértékű sejthalált váltottak ki PRR stimulust követően, mint a tolerogén stimulus hiányában tenyésztett

DS-ek. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy a tolerogén mikrokörnyezet csökkentheti a DS sejtpusztító képességét. Meglepő módon az immunmoduláló hatással rendelkező, I. típusú interferon jelenléte bár némileg fokozta, szignifikánsan nem változtatta meg a DS felülűző-indukált citotoxicitást az IFN- α hiányában tenyésztett DS-ekhez viszonyítva. A RIPK1 által közvetített sejthalál folyamatról ismert, hogy a hatékony keresztprezentáció egyik előfeltétele. Elméletünk alátámasztásához, miszerint a DS-ek sejtlő képessége antigének feltárására szolgál a keresztprezentálás céljából, megvizsgáltuk a DS felülűző által kiváltott sejthalál RIPK1 függését. Összehasonlítottuk a DS felülűzők hatását a vad típusú, SVT35 és a RIPK1 deficiens Jurkat célsejteken. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a DS citotoxicitás legalább részben RIPK1-függő folyamat, mivel a RIPK1 $+/+$ célsejteken nagyobb mértékű sejthalált váltott ki a felülűzők adása, mint a RIPK1 $-/-$ sejtvonalon. Ezen kívül a célsejteken a RIPK1 fokozott foszforilációja és a RIPK1-kaspáz-8 kölcsönhatás növekedése szintén arra utal, hogy a RIPK1-függő jelátviteli utak is részt vesznek a DS felülűző által kiváltott sejthalálban. Ez a megfigyelés megerősíti a hipotézisünket, a DS-ek immunogén/RIPK1-függő sejthalált indukálnak, hogy ezzel elősegítsék a környező sejtekből származó intracelluláris antigén fragmensekhez való hozzáférést.

A DS-ek sejtlő képességét a szakirodalomban többnyire szolubilis ligandumokhoz kapcsolják. Kísérleti rendszerünkben vizsgáltuk a DS által kiváltott sejthalál jelátviteli folyamatait. Megfigyeltük, hogy a TNF:Fc gátolta a DS citotoxikus aktivitását, ellentétben a Fas és a TRAIL antagonistákkal. Ez alapján elmondható, hogy a DS-ek citotoxikus képességét a TNF α szekréció közvetíti, melyben a FasL vagy a TRAIL sejthalál ligandumoknak nincs kimutatható szerepe. A TNF receptor jelátvitel a sejthalált kiváltó komplex összetételétől függően RIPK1-függő apoptózist vagy RIPK1-függő nekroptózist is előidézhethet. Az apoptotikus és nekroptotikus folyamatokra specifikus inhibitorokat alkalmazva vizsgáltuk, hogy a DS felülűző milyen típusú sejthalált vált ki a célsejteken. Megállapítottuk, hogy a felülűzők által indukált sejthalál apoptózis, mivel kaspáz inhibitorral gátolható volt. Ezzel szemben a necrostatin-1 nekroptózis gátlószer adása nem módosította a felülűző toxikus hatását.

Kutatómunkánk során kimutattuk, hogy rövid ideig tartó PRR ligandumokkal kondicionált DS-ek felülűzője RIPK1-függő módon indukálja a célsejtek apoptózisát. Ezen eredmények lehetőséget nyújtanak a tumorokkal szemben alkalmazott citotoxikus hatású terápiás mechanizmusok bővítésére.

6. Összefoglalás

Napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy az immunrendszer aktivációja és bizonyos sejthalál folyamatok összekapcsolódnak. A veleszületett immunrendszer legfőbb sejt alkotói a makrofágok és a DS-ek, amelyek a kórokozók jelenlétére válaszul pro-inflammatórikus reakciót generálnak. Az immunsejtek túlzott aktivációja azonban szövethárosodást okozhat, és olyan kórképekhez vezethet, mint az autoimmun vagy tumoros megbetegedések. Tanulmányoztuk a gyulladást kiváltó nekroptózist és az apoptózis RIPK1-függő formáját.

Megfigyeltük, hogy a makrofág sejtípusok eltérő érzékenységet mutatnak a TAK1 inhibitor kezelésre, amely intenzívebb nekroptózist indukált az M2 és TAM-szerű sejtekben. Eredményeink alapján az eltérő nekroptózis-érzékenység nem az M2 által termelt autokrin citotoxikus, vagy az M1 által termelt túlélő faktor hatása. Magyarázat lehet erre, hogy eddig ismeretlen jelátviteli mechanizmusok túlélő jelet biztosíthatnak az M1 makrofágokban. Eredményeink szerint legalább két nekroptotikus útvonal működik a makrofágokban. Továbbá a makrofág funkciók szabályozására alkalmas körülményeket azonosítottunk, amikor a TAK1-gátló használatával az M1 és M2 sejthalálra való hajlamuk eltérő.

A RIPK1-függő sejthalál folyamatok molekuláris mechanizmusát moDS-ekben tanulmányoztuk. A DS-ek citotoxikus képességgel is rendelkeznek, ezáltal képesek a környező sejtek apoptózisát indukálni. Ez lehetőséget biztosít a környező sejtek antigénjeinek felszabadítására és a mikroökönyezetük monitorozására. Feltételeztünk, hogy a sejtkárosító hatást a patogének érzékelése váltja ki. Eredményeink szerint a DS-ek rövid ideig tartó, PRR agonistákkal kondicionált felülűszója különböző sejt vonalakban képes sejthalált indukálni. A humán moDS-ek szerte a szervezetben előfordulnak, hozzájárulnak az immunrendszer és a szöveti mikroökönyezet közötti információk átadásához, ezáltal az immunválaszok finomhangolását látják el mind normál, mind pedig patológiás körülmények között. Megfigyeltük, hogy az általunk vizsgált, tolerogén mikroökönyezet csökkentheti a DS sejtpusztító képességét, míg az IFN- α jelenlétében differenciált immunogén DS-ek felülűszója nem befolyásolta a sejthalál mértékét. Munkánk során kimutattuk, hogy a rövid ideig tartó PRR stimulus hatására a DS-ek felülűszója RIPK1-függő módon a célsejtek apoptózisát váltja ki.

Összegzésként elmondható, hogy olyan mechanizmusokat tárnunk fel a makrofág és a DS funkciók szabályozásában, amelyek reményeink szerint felhasználhatóak lesznek különböző gyulladásos folyamatok vagy tumoros megbetegedések immunterápiás célpontjaiként is.

7. Publikációk



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/11/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Varga Zsófia

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, Z.**, Rácz, E., Türk-Mázló, A., Korodi, M., Szabó, A., Molnár, T., Szőőr, Á., Veréb, Z., Bácsi, A., Koncz, G.: Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death.
Immunobiology. 226 (1), 1-7, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152032>
IF: 2.788 (2019)
2. **Varga, Z.**, Molnár, T., Türk-Mázló, A., Kovács, R., Jenei, V., Kerekes, K., Bácsi, A., Koncz, G.: Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis.
Cancer Immunol. Immunother. 8, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02623-7>
IF: 5.442 (2019)





További közlemények

3. Hancz, D., Szabó, A., Molnár, T., **Varga, Z.**, Hancz, A., Gregus, A., Hueber, A. O., Rajnavölgyi, É.,
Koncz, G.: Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent
manner.
Immunol. Lett. 193, 42-50, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.11.007>
IF: 2.552
4. Bene, K., **Varga, Z.**, Petrov, V. O., Boyko, N. V., Rajnavölgyi, É.: Gut Microbiota Species Can
Provoke both Inflammatory and Tolerogenic Immune Responses in Human Dendritic Cells
Mediated by Retinoic Acid Receptor Alpha Ligand.
Front. Immunol. 8 (427), 1-17, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00427>
IF: 5.511

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16,293

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,23**

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, 2021.01.11.



8. Kulcsszavak

nekroptózis; makrofág; tumor; gyulladás, dendritikus sejt; citotoxicitás; immunogén sejthalál; RIPK1; immuntolerancia

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak a dolgozatom elkészítéséhez.

Elsőként témavezetőmnek, Dr. Koncz Gábornak szeretnék köszönetet mondani segítőkészségéért, gyakorlati és elméleti tanácsaiért. Hálás vagyok a Tőle kapott gondolkodásmódért, a munkámmal szemben való kritikus hozzáállásért.

Köszönöm az Immunológiai Intézet jelenlegi és korábbi igazgatójának, Prof. Dr. Bácsi Attilának és Prof. Dr. Bíró Tamásnak, hogy lehetőséget biztosítottak munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához.

Külön köszönet illeti Molnár Tamást, Türk-Mázló Anettet, Korodi Mónikát és Jakab-Rácz Evelint, akik nagyon sokat segítettek a doktori értekezésben bemutatott kísérletek tervezésében és kivitelezésében egyaránt. Köszönöm a PhD éveim alatt nyújtott támogatásukat és a tartalmas beszélgetéseket.

Valamint köszönöm Bíró-Debreceni Zsuzsannának, hogy segítette és támogatta a laboratóriumi munkám szakszerű és pontos elvégzését, Jó tanácsaiból és gyakorlatias meglátásaiból sokat tanulhattam az évek folyamán.

Szeretnék köszönetet mondani az Immunológiai Intézet összes jelenlegi és volt munkatársának, akik az évek során nem csak kollégaként, de barátként is támogattak. Nekik köszönhetően nem csak a munka marad emlékezetes PhD éveimből.

Köszönettel tartozom a családomnak, akik egy percre sem kételkedtek benne, hogy képes leszek elérni a kitűzött célokat. Hálás vagyok a páromnak és barátaimnak is, hogy mindig türelmesen és megértően végig hallgattak.

A doktori munka a következő pénzügyi támogatásokkal valósult meg:

NKFIH-K-125224, GINOP-2.3.2-15-2016-00050, Romanian Ministry of Education, Executive Agency For Higher Education, Research, Development and Innovation Funding, PNCDI II, project no. 119/2014.