

Doktori (PhD) értekezés tézisei

RIG-I aktivációt és 8-oxoguanin által kiváltott szignálokat követő változások a humán dendritikus sejtekben

Sütő Máté István

Témavezető: Prof. Dr. Bácsi Attila



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2021

RIG-I aktivációt és 8-oxoguanin által kiváltott szignálokat követő változások a humán dendritikus sejtekben

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

Írta: **Sütő Máté István**

Molekuláris Biológus

Készült a Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bácsi Attila, PhD, MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök:

Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

Tagok:

Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, MTA doktora

Dr. Sándor Noémi, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Immunológiai Intézet,
Diskussziós terem (online), 2020.07.17 14:00

Az értekezés bírálói: Dr. Buzás Krisztina, PhD

Dr. Kapitány Anikó, PhD

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Nagy György, MTA doktora

Dr. Benkő Szilvia, PhD

Az védés helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Gyermekgyógyászati Klinika
Előadóterme, 2021.09.06 13:00

1. Bevezetés

A dendritikus sejtek (DS-ek) endogén és exogén eredetű veszélyjelek széles spektrumát képesek felismerni, majd a felismerést követően a fellépő immunválaszt koordinálni, így a szervezet homeosztázisának fenntartásában kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A DS-ek azon kívül, hogy professzionális antigén prezentáló sejtekként működnek, alpopulációi más-más speciális feladatok ellátására is képesek, mint a kereszt prezentáció, az izotípus váltás támogatása, gyulladásos környezet kialakítása, antivirális citokinek nagy mennyiségű termelése.

Egyes anyagcsere folyamatok során, gyulladás, valamint külső oxidatív tényezők hatására a sejtekben megnövekedhet a különböző oxidatív gyökök mennyisége. Oxidatív környezetben különböző makromolekulák károsodhatnak, akár a sejtek genomi DNS-e is. Az egyik leggyakrabban kialakuló DNS bázis módosulat a 8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoG), amely javítás nélkül transzverziós mutációt eredményezhet. A lézió javítására a 8-oxoG DNS glikoziláz 1 (OGG1) enzim specializálódott az emlős sejtekben, mely bázis excíziós repair (BER) mechanizmus során kihatja az intrahelikális 8-oxoG-t. Nemrég írták le, hogy a DNS-ből eltávolított 8-oxoG képes az OGG1-hez kötődni, annak aktív centrumától eltérő helyen, majd a kialakuló OGG1-8-oxoG komplex guanozil cserélő faktor (GEF) aktivitásra tehet szert, így kis molekulatömegű GTPázokat aktiválhat. A 8-oxoG-nal kezelt egerek tüdejének transzkriptóm vizsgálatából kiderült, hogy számos biológiai funkcióval kapcsolatban álló gén expressziója fokozódik az intranazális kezelés hatására. Ezen előzetes eredmények alapján felmerült bennünk a kérdés, hogy képes lehet-e az exogén 8-oxoG a dendritikus sejtek funkcióit is befolyásolni.

A veszélytett immunitás sejtjeiről már korábban leírták, hogy Toll-szerű receptor (TLR) stimulációt követően metabolikus váltáson mennek keresztül, ami szükséges az aktivációjukhoz, valamint a gyulladásos, illetve antimikrobiális molekulák termeléséhez. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a DS-ek egyik altípusában, az interferonok (IFN-ok) termelésére specializálódott plazmacitoid DS-ekben (pDS-ekben), a vírus szenzor retinsav indukálható gén 1 (RIG-I) receptor citoszolikus kifejeződéséhez az endoszómális TLR9 receptor előzetes aktivációja szükséges. A RIG-I aktivációt követő metabolikus változások kevésbé feltártak, így kísérleteink során összehasonlítottuk ezeket a folyamatokat a pDS-ekben és a RIG-I-et konstitutív módon kifejező monocita-eredetű DS-ekben.

2. Irodalmi áttekintés

A veleszületett immunitás a patogének elleni védelmi rendszerünk első vonala. Ez a rendszer felismeri azokat a konzervált, közös molekuláris mintázatokat, amelyek a bennünket körülvevő számtalan kórokozóban megtalálhatóak, de a humán szövetekben normál körülmények között nincsenek jelen. A veleszületett (angolul innate) védekezés fizikai, kémiai és sejtes komponensekből áll, melyek fő funkciója, hogy megakadályozza a kórokozó bejutását és szaporodását a szervezetben, eltávolítsa a bejutott mikrobákat és aktiválja az adaptív immunrendszer sejtjeit. A veleszületett immunrendszer fő sejtes alkotói a granulocyták, a makrofágok, a dendritikus sejtek (DS-ek), valamint a veleszületett limfoid sejtek (ILC-k), melyek közé tartoznak a természetes ölősejtek (NK sejtek) is.

Az immunrendszer másik ága, az adaptív, vagy más néven szerzett immunitás. A veleszületett immunitással ellentétben, az adaptív rendszernek hosszabb időre (napok) van szüksége ahhoz, hogy sejtjei és az általuk termelt fehérjék, effektíven képesek legyenek fellépni egyes kórokozókkal szemben. Az adaptív immunrendszerre jellemző a nagy specificitás, és az immunológiai memória kialakulása. Az adaptív immunrendszer megfelelő működésének feltétele a veleszületett immunrendszer előzetes aktiválódása.

Az 1980-as években már ismert volt, hogy a veleszületett és az adaptív immunitás valamilyen módon kapcsolatban állnak, azonban az együttműködés pontosabb mechanizmusát csak a Ralph Steinman által leírt DS-ek további vizsgálatával tudták meghatározni. A DS-ek professzionális antigén prezentáló sejtek (APS-ek), melyek egyik feladata az adaptív immunválasz beindítása a patogén felismerését követően. Ehhez az I-es, vagy II-es típusú hisztokompatibilitási komplex molekulájukon (MHC I, MHC II) prezentálják az antigént a T sejtek számára. A patogének érzékelése mintázat-felismerő receptorokkal (PRR) történik, amelyek képesek felismerni a patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP-ok). A sejt- és szövetkárosodások során felszabaduló molekulák egy része (veszély-asszociált molekuláris mintázatok, DAMP-ok) szintén aktiválja a PRR-eket, így beindíthatja a veleszületett immunválaszokat.

2.1 A dendritikus sejtek általános jellemzése

A DS-ek rendkívül fontos szerepet játszanak az exogén és endogén eredetű antigének bemutatásában, és ez által az adaptív immunválaszok elindításában. Hivatásos antigén prezentáló sejtekként képesek az antigéneket MHC-I vagy MHC-II molekulákon keresztül bemutatni a citotoxikus és a segítő T sejtek számára. Ko-stimulációs szignálok jelenlétében immunogén, ko-stimuláció hiányában tolerogén immunválaszokat váltanak ki. Az első

közleményt a DS-ekről Ralph Steinmann és Zanvil Cohn 1973-ban publikálta. Munkájuk során olyan nyúlványos sejteket figyeltek meg egér szekunder nyirokszervekben, melyek sejt kultúrában erősen letapadtak a tenyésztőedény aljára. Először úgy gondolták, hogy ezek kizárólag lymphoid eredetű sejtek, azonban később kiderült, hogy mind lymphoid, mind myeloid eredetűek lehetnek. Jelenlegi tudásunk alapján, a humán dendritikus sejteknek legalább három fő populációját különítjük el. Ezek a myeloid eredetű klasszikus, vagy konvencionális dendritikus sejtek (cDS1 és cDS2 sejtek), a monocita eredetű dendritikus sejtek (moDS-ek), valamint a lymphoid eredetű pDS-ek. Egyes szerzők - negyedik DS altípusként - a Langerhans sejteket (LS-ek) külön csoportként kezelik.

2.2 A dendritikus sejtek PAMP és DAMP receptorai

A mintázat-felismerő felismerő receptorok felfedezése új irányba terelte a veleszületett immunitásról addig alkotott képet. Kiderült, hogy ezek a PRR-ek kulcsfontosságúak az immunológiai reakciók elindításában, valamint az általuk generált szignálok fontosak a veleszületett és a szerzett immunitás közti kommunikációban is.

A dendritikus sejtek a legtöbbféle PRR-rel rendelkező sejtek közé tartoznak. Nem csak patogénekből (PAMP-okból) származó, de saját veszély jeleket (veszély asszociált molekuláris mintázatok, DAMP) is képesek érzékelni, igaz ezeknek a receptoroknak a specificitása limitált. A PRR-ek a fertőzések detektálása mellett, fontos szerepet töltenek be a sebgyógyulásban, az allergiás, valamint az autoimmun megbetegedések, illetve a transzplantációk után felmerülő kilökődési reakciók patomechanizmusában is. A PRR gyűjtő fogalom, amely magába foglalja a Toll-szerű receptorokat, a NOD-szerű receptorokat (NLR), a RIG-I-szerű receptorokat (RLR), az AIM2-szerű receptorokat (ALR) és a C-típusú lektin receptorokat (CLR). Ezek a receptorok különböző mértékben aktiválódnak a ligandumaikkal való találkozás alkalmával és a downstream jelátvitelnek megfelelően különböző válaszokat alakíthatnak ki a DS-ekben.

2.2.1 Endoszómális TLR-ek a dendritikus sejtekben

A vírusfertőzések során, az elsődleges szenzorok az endoszómális TLR-ek, illetve a citoszolban található RLR-ek. Négy endoszómális TLR-t különítünk el, a TLR3-at, a TLR7-et, a TLR8-at és a TLR9-et. A TLR3 nem csak endoszómálisan, de a sejtfelszínen is megjelenhet egyes sejt típusoknál. Jelenlegi tudásunk szerint a virális fertőzésekre jellemző 40 bp-nál hosszabb duplaszálú RNS-ek (dsRNS) ribóz-foszfát gerincét ismeri fel. Egyes munkacsoportok feltételezik, hogy szerepe lehet az endogén dsRNS-ek felismerésében is, ám ezeknél a folyamatoknál a pontos ligandum még nem ismert.

A TLR7/8 expressziója és funkciójuk igen jellegzetes különféle sejteknél. Míg a TLR7 szinte csak a pDS-ekben és B sejtekben fejeződik ki, addig a TLR8 leginkább a humán myeloid sejtekre jellemző. A TLR7 aktivációja a pDS-ek nagymértékű I-es típusú IFN termelését eredményezi, míg a TLR8-mediált szignálok nagy mennyiségű IL-12p70 szekréciót indítanak be a myeloid sejtekben.

A TLR9 leginkább az endoszómába kerülő, metilálatlan CpG motívumokat, egy az eukarióta genomi DNS-re nem jellemző mintázatot ismerik fel, így megkülönböztetve a saját és nem saját eredetű DNS molekulákat. Kifejeződése szintén nagy sejt- és fajspecifitást mutat. Emberekben, szinte kizárólag pDS-ekben és B sejtekben fejeződik ki, aktivációja I-es típusú IFN választ, illetve poliklonális B sejt aktivációt okoz.

2.2.2 RIG-I receptorok a dendritikus sejtekben

Akár csak a TLR-ek az RLR-ek is sejtípusonként különböző expressziós mintázatokat mutatnak. Míg a cDS-ekben a RIG-I receptorok konstitutív módon kifejeződnek, addig a pDS-ekről sokáig úgy gondolták, hogy bennük ezek a receptorok nem, vagy csak nagyon kis mértékben expresszálódnak. Munkacsoportunk nemrégiben kimutatta, hogy ennek a receptornak a kifejeződése az I-es típusú IFN-októl független módon indukálható pDS-ekben is, endoszómális TLR7 vagy TLR9 stimulust követően.

Jelenleg három féle RLR-t különböztetünk meg. A RIG-I-t, a *melanoma differentiation associated 5*-öt (MDA5) és a *laboratory of genetics and physiology 2*-t (LGP2), melyek mindegyike különböző virális eredetű dsRNS ligandumot képes felismerni a sejt citoplazmájában. Ezen kívül az LGP2-ről kimutatták azt is, hogy szabályozó szerepet játszik a fentebb említett két receptor szignalizációja során, valamint, hogy a többi RLR-el ellentétben nem rendelkezik CARD doménnel. A RIG-I és az MDA5 a CARD domének oligomerizációt követően lépnek interakcióba a mitokondriális antivirális szignalizációs (MAVS) komplexszel, mely a jelet a citoszolikus IKK és TANK kötő kináz 1 (TBK1) protein kinázoknak közvetíti, hogy azok aktiválják az NF- κ B és az IRF3 transzkripciós faktorokat és így az antivirális válaszokat.

2.3 A dendritikus sejtek aktivációját követő metabolikus változások

Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb hangsúly került az immunsejtek metabolizmusának vizsgálatára. Tudjuk, hogy a veleszületett immunitás sejtjei PAMP, DAMP, valamint citokin stimulust követően jelentős fenotípusos és funkcionális változásokon mennek keresztül. Azt is sikerült feltárni, hogy ezeket a folyamatokat egy metabolikus váltás is kíséri, mely biztosítja a sejtek megváltozott energetikai igényeit.

A nyugvó állapotú DS-ek alapvetően katabolikus metabolizmust mutatnak oxidatív foszforáció (OXPHOS) fedezi. Ezeket a folyamatokat az adenosin monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK) szabályozza. A felépítő folyamatokhoz szükséges glikolitikus intermedierek előállításához pedig az intracelluláris glikogént használják forrásként. Aktivációt követően a DS-ek glikolízissel és tejsavas erjedéssel, biztosítják energia szükségleteiket.

A glikolízis fokozódása a DS aktiváció egyik jellegzetes folyamata. A glükóz-piruvát útvonal gátlása hosszú távon képes befolyásolni a DS-ek érését és aktivációját. Ha a glikolízis bármilyen zavart szenved (blokkoló ágens, genetikai defektus) az *in vitro* differenciáltatott DS-ek aktivációja sem zajlik le. Az ilyen DS-ek TLR-4 ligandummal történő stimulációt követően, a T sejt polarizáló képességük is zavart szenved. Az influenza A vírussal aktivált humán pDS-eknél, a 2-DG kezelés hatására szintén csökken a ko-stimulációs képességük, illetve az I-es típusú interferon (IFN-I) expressziója is.

A glikolitikus váltásnak több szabályozási pontja is van a DS-ekben. A DS-ekben a glikolitikus váltás az aktivációt követően percekben belül megkezdődik, melyhez az intracelluláris glikogént hasznosítják. Az indukálható glükóz transzporter 1 (GLUT1) kifejeződése azonban csak órákkal a TLR-stimulációt követően emelkedik meg. Az aktiválást követő későbbi időintervallumban, azonban megnő a sejtek extracelluláris glükózfelvetele. Érdekes megfigyelés, hogy 18-24 órával a DS aktiváció után - amikor a DS-ek már a nyirokcsomóba jutottak – a glükóz gátolja a DS-mediált T sejt válaszokat. Ha több órával az aktivációt követően glükóz helyett galaktóz tartalmazó médiumban tenyésztették a DS-eket megnövekedett a ko-stimulatórikus molekulák kifejeződése a felszínükön.

A glikolitikus váltást rövid távon leginkább a TANK-kötő kináz-1 (TBK1)/I κ B kináz- ϵ (IKK ϵ)/AKT/hexokináz 2 (HK2) útvonal aktivációja vezérli, ezek a folyamatok támogatják a glikolízis beindulását, valamint a glikolízis fenntartását a sejt aktivációját követő korai szakaszban. A DS immunogén stimulusát követően az AMPK inaktivációja, valamint a PI3K/AKT/mTOR útvonal indukciója maga után vonja a glikolitikus enzimek, mint az LDHA, a piruvát kináz 2 (PKM2), a foszfofruktokináz (PFK), valamint a glükóz transzporter GLUT1 kifejeződésének fokozódását. Az AMPK aktivációjának fokozódása fordítottan hat a DS-ek érésére, így az aktív AMPK a csökkent proinflammatórikus DS funkciókkal áll összefüggésben. Az mTOR/mTORC1 gátlása következtében hosszabb távon alacsonyabb lesz az aktivált sejt glükóz fogyasztása, laktát termelése, a glikolitikus enzimek, valamint glükóz transzporterek kifejeződése és az extracelluláris savasodási ráta (ECAR) is. Összességében úgy tűnik, hogy az mTOR képes hosszú távon irányítani a DS-ek aktiváltságát.

A HIF1 α stabilizációja szintén fokozódó glikolitikus aktivációt eredményező folyamat, mivel a glikolitikus gének nagytöbbsége HIF1 α célgén is. Hipoxiás közegben megnő a DS-ek

felszínén a ko-stimulatórikus és az MHC-II molekulák kifejeződése, emellett fokozódik a sejtek glükózfogyasztása, a glikolitikus enzimek kifejeződése, illetve az ATP és laktát termelésük is. A HIF1 α hiánya, vagy működésének gátlása esetén ezek a jelenségek nem figyelhetők meg.

2.4.1 Az oxidatív stressz hatására létrejövő DNS károsodások és azok javítása

Oxidatív stressz akkor lép fel egy szervezetben, amikor az oxidatív hatások és az antioxidáns kapacitás közti egyensúly felborul. Az oxidatív ágensek endogén, illetve exogén eredetűek is lehetnek. Jelentős mennyiségű reaktív oxigénszármazékok termelődnek a mitokondriális légzési lánc működése során. Ezen kívül a gyulladások folyamatok is számottevő forrásai az endogén ROS-nak. A fagocita sejtek például bekebelezett baktériumok, valamint vírusok elpusztításához NADPH oxidázok révén termelnek ROS-t. Az exogén eredetű ROS forrásai lehetnek a különböző sugárzások, légszennyező részecskék vagy akár a növényi pollenek NADPH oxidázai is.

Habár a reaktív gyököknek fontos szerepük van a sejtek homeosztázisának fenntartásában, a mikróbák elleni védekezésben és egyes szignalizációs útvonalakban, fokozott koncentrációjuk esetén több makromolekula is oxidálódhat. Különböző fehérjékben, lipidekben és akár a DNS-ben is kialakulhatnak oxidatív károsodások. Az oxidatív stressz a DNS-t többféle módon is károsíthatja. Létrejöhét teljes vagy részleges lánctörés, a purin és pirimidin bázisok, vagy a cukorrész módosulásai, vagy fehérjékkel történő keresztkötődés is. Ezek a módosulások fontos szerepet játszhatnak több betegség kialakulásában és pathomechanizmusukban.

A DNS-ben található bázisok közül, a guanin bázisok a legfogékonyabbak az oxidatív károsodásra, hiszen ezek a bázisok rendelkeznek a legkisebb oxidációs potenciállal. A guanin különböző oxidált formái közül, a 8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoG) a leggyakrabban előforduló módosulat. Ha ez a károsodott bázis nem kerül kijavításra a replikáció folyamán, transzverziós mutáció jöhet létre az újonnan szintetizálódó DNS szálban.

Az emlősökben a 8-oxoG kijavításáért felelős egyik enzim a 8-oxoguanin DNS glikoziláz 1 (OGG1), mely képes az intrahelikális 8-oxoG-t elektrokémiai tulajdonságai alapján felismerni, majd bázis excíziós repair (BER) mechanizmus során kivágni a DNS-ből. Annak érdekében, hogy az eukarióta sejtek fenn tudják tartani genomi stabilitásukat mind a sejtmag, mind pedig a mitokondrium szintjén, a károsodott DNS-t ki kell javítaniuk. Az oxidatív károsodások javításának egyik fő útvonala a BER. Habár az emlősökben már közel egy tucat glikoziláz enzimet leírtak, három olyan főbb enzim található köztük, melyik képes oxidációt követően a BER folyamatot beindítani. Ezek közül az egyik legfontosabb az OGG1, mely habár képes

egyéb oxidált purint is felismerni, elsődlegesen a 8-oxoG-t távolítja el, valamint bifunkcionális enzimként AP liáz aktivitással is rendelkezik.

Úgy gondolhatnánk, hogy az OGG1 hiányában felgyülemelő mutációk jelentős károsodást okoznak a sejtek működésében. Az oxidatív stressz következtében kialakuló DNS károsodásokat valóban számos betegséggel és az öregedéssel is összefüggésbe hozzák. Azonban OGG1 knock out (OGG1^{-/-}) egerekben ez a feltételezés nem igazolódik. Krónikus oxidatív stressz hatására ezekben az állatokban nem növekszik meg a tumorok kialakulásának gyakorisága, és habár a genomi 8-oxoG szint is jóval a fiziológiás tartomány felett van, az életidejük nem csökken szignifikáns mértékben. Meglepő módon, a vad-típusú társaikhoz viszonyítva a különböző gyulladásokkal - például az LPS kezeléssel kiváltott gyulladással - szemben is ellenállóbbnak bizonyulnak. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az OGG1 -nek vagy a felszabaduló 8-oxoG-nak lehet olyan hatása, amely felelős a gyulladásos válaszok beindításáért.

2.4.2 OGG1 BER-t követő változások

Régebben úgy gondolták, hogy a 8-oxoG kis molekula lévén, passzív módon távozik a sejtől, majd a későbbiekben a vizelettel kiválasztódik a szervezetből. Nemrégiben azonban kiderült, hogy az OGG1 képes nagy affinitással megkötni a BER során létrejövő 8-oxoG-t az aktív centrumától eltérő helyen, és ezzel konformáció változást követően új funkciót nyer. A kialakuló OGG1-8-oxoG komplex guanin-nukleotid cserélő faktorként (NEF) képes a kismolekula súlyú GTPázokat aktiválni, mint például a K-Ras, Rac1 és RhoA, és így fokozni a down-stream gének kifejeződését. Oxidatív környezetben az OGG1 képes az NF- κ B promóter régiójához kötődni, és ezzel fokozza a pro- inflammatorikus gének kifejeződését. Mindezek mellett, nemrégiben azt is kimutatták, hogy az OGG1-BER folyamat hatása jól modellezhető a sejtek 8-oxoG kezelésével. A 8-oxoG expozíció hatására fokozódtak a homeosztatikus, valamint az immunrendszer működésével összefüggő gének kifejeződése.

3. Célkitűzések

Vizsgálataink során a 8-oxoG kezelés és a RIG-I-mediált aktiváció hatásait kívántuk tanulmányozni dendritikus sejteken *in vivo* és *in vitro* modell rendszerekben. Kísérleteink során az alábbi kérdésekre próbáltuk válaszolni:

1/1 A 8-oxoG-nal történő intranazális kezelés megváltoztatja-e a DS funkciókhoz köthető gének expresszióját az egerek tüdejében?

1/2 Az intranazális allergénnel együtt adott 8-oxoG fokozza-e az allergén-specifikus ellenanyagok termelődését egerekben?

1/3 Az exogén 8-oxoG megváltoztatja-e a humán moDS-ek fenotípusát, valamint citokin és kemokin termelésüket? Ha igen, a mechanizmus függ-e az OGG1 kifejeződésétől?

2/1 A TLR-stimuláció következtében kialakuló és a RIG-I-által kiváltott I-es típusú IFN válasz függ-e a glikolízistől humán plazmacitoid dendritikus sejtekben?

2/2 A RIG-I-indukált I-es típusú IFN termelés függ-e a glikolízistől humán moDS-ekben?

2/3 A TLR9-stimulált primer humán pDS-ek és a RIG-I-aktivált moDS-ek által indukált proliferációja az allogén, naív T sejteknek glikolízis-függő folyamat-e?

4. Anyagok és módszerek

4.1 Állatok kezelése transzkriptom analízishez

A kísérletekhez nyolchetes BALB/c egereket használtunk. Az egereket ($n=5$ /csoport), enyhe anesztézia mellett, intranazálisan (i.n.) kezeltük egyszeri kezelés esetén a 0., valamint többszörös kezelésnél a 0., 2. és 4. napon 60 μ l pH-semlegesített 8-oxoG oldattal (pH: 4,5; 0,0005 mg/kg), vagy fiziológiás sóoldattal. A reagens LPS koncentrációja minden esetben a detektálható szint alatt volt. Az állatokat a kezeléseket követő (mind egyszeri, mind többszöri kezeléseknél) különböző időpontokban (0, 30, 60 és 120 perc) termináltuk, hogy a tüdőkből RNS-t izolálhassunk.

4.2 Egerek kezelése az allergén-specifikus IgM és IgE ellenanyagok szérumszintjeinek meghatározásához

Nyolc hetes nőstény BALB/c egereket ($n= 8$ csoportonként), enyhe anesztézia alatt, intranazálisan kezeltünk 8 μ g/egér ovalbuminnal önmagában 60 μ l térfogatban, vagy 0,1, 1 vagy 10 μ M-os pH-kiegyenlített 8-oxoG oldattal kombinációban, 0-tól 4. napig, illetve a 8. és 28. napon. Kontrollként megegyező térfogatú PBS kezelést használtunk. A 30. napon az egereket termináltuk, a szérum OVA-specifikus IgM és IgE szinteket ELISA kit-ek felhasználásával mértük a gyártó útmutatóinak megfelelően. Az abszorbanciát Synergy HT micropalte reader-rel detektáltuk 450 nm-en.

4.3 Primer humán sejtek szeparálása

A periferiális vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Paque Plus gradiens centrifugálással nyertük ki a „buffy coat”-ból. A PBMC-kből a monocitákat pozitív szelekció során, anti-CD14 konjugált mikrogöngyökkal választottuk el, mágneses sejtszeparálással a gyártó utasításai szerint. A frissen izolált monocitákban a géncsendesítést elektroporációval végeztük. A DS-ek differenciációjához az elektroporált, és nem elektroporált monocitákat 24 lyukú sejttenyésztő lemezekre tettük 1×10^6 sejt/ml számban. A tenyésztést RPMI 1640 médiumban végeztük. Ezt 100 U/ml penicilinnel, 100 μ g/ml streptomycinnel, 10% hőinaktivált magzati marha szérummal, 80 ng/ml granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktorról és 100 ng/ml IL-4-gyel egészítettük ki. A második napon a tenyésztő médium felét lecseréltük friss médiumra, és az előzőekkel megegyező mennyiségű GM-CSF-fel és IL-4-gyel kiegészítettük. Kísérletekhez a sejteket az ötödik napon használtuk, amikor éretlen DS-ekre jellemző fenotípussal (DC-SIGN/CD209⁺, CD14⁻, CD1a⁺) rendelkeztek. A primer humán pDS-eket pozitív szelekcióval izoláltunk PBMC-ből, CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) *MicroBead Kit* felhasználásával, majd 1×10^5 sejt/ 200 μ l RPMI 1640 médiumban, 96 lyukú sejttenyésztő lemezre tettük. A médiumot

10% hőinaktivált FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel és 50 ng/ml rekombináns humán IL-3-mal egészítettük ki. A ko-kultúra kísérletekhez PBMC-ből allogen naív CD8⁺ T sejteket izoláltunk, *Human naïve CD8⁺ T cell isolation kit*-tel, a gyártó utasításainak megfelelően.

4.4 A GEN2.2 sejtvonala

Kísérleteinkhez a Dr. Joel Plumas és Dr. Laurence Chaperot által rendelkezésre bocsátott humán plazmacitoid dendritikus sejtvonala, a GEN2.2-t használtuk. A GEN2.2 sejteket mitomycin C-vel kezelt egér MS5 (Cat. No. ACC 441, Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) *feeder* rétegen növesztettük 10% hőinaktivált FBS-sel (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel (mindkettő Sigma-Aldrich) és 5% nem esszenciális aminosavakkal (Life Technologies Corporation) kiegészített RPMI 1640 médiumban. A kísérletekhez, a GEN2.2 sejteket eltávolítottuk a *feeder* sejtrétegről, majd 24 lyukú tenyésztőlemezekre helyeztük azokat 5x10⁵ sejt/ 500 µl sűrűségben, RPMI 1640 médiumban. A sejtvonala tenyésztését és az inkubációkat 37°C-os termosztátban végeztük, 5% CO₂ szaturáció mellett.

4.5 A sejtek kezelése

A moDS-eket a tenyésztés 5. napján 24 óráig növekvő koncentrációjú 8-oxoG-nal (1, 10, 100 µM), TLR7/8 ligandummal vagy TLR9 agonista CpG-B-vel (5 µM) kezeltünk. Inkubációs időszakokban a sejteket 37°C-on, párasított, 5% CO₂ inkubátorban tartottuk. A TLR aktivációhoz a GEN2.2 sejteket és a primer pDS-eket 12 órán keresztül CpG-A (1 µM) TLR9 agonistával kezeltük. RIG-I expresszió indukálásához a GEN2.2, illetve primer pDS sejteket 0,25 µM CpG-A-val előkezeltük 16 órán keresztül, majd átmostuk a sejteket, és friss RPMI 1640 médiumban tettük ki azokat. Ezután a sejteket 5' ppp-dsRNS-sel, specifikus RIG-I agonistával stimuláltuk, LyoVecTM transzfekciós reagens felhasználásával, a gyártó felhasználási útmutatásai szerint.

Minden kísérletnél 25 µl, 1 µg/ml koncentrációjú RIG-I ligandumot tartalmazó 5' ppp-dsRNS-LyoVecTM komplexet adtunk a sejtekhez a jelzett időpontokban. MoDS-eknél a differenciáció 5. napján a sejt-kultúra médiumok felét eltávolítottuk és friss médiumra cseréltük, majd a sejteket 12 órás 5' ppp-dsRNS-LyoVecTM komplex expozíciónak tettük ki. Párhuzamos kísérletben a sejteket jelzett koncentrációjú glikolízis inhibitor 2-deoxi-D glükózzal (2-DG,) kezeltük.

4.6 RNS izolálás egér tüdőből

Nazális kezelést követően, eltávolítottuk az egerek tüdejét, majd lízis pufferben, *TissueMiser*® készülékkel homogenizáltuk azokat. Az RNS izolálása *RNeasy kit* használatával történt, a gyártó által megadott leírásnak megfelelően. Az RNS koncentrációkat *Epoch Take-3™ system* készüléken, Gen5 2.01-es verziójú szoftver használatával határoztuk meg. Az egyes kísérleti csoportokból származó egerekből (n=5) egyenlő mennyiségű RNS-t gyűjtöttünk össze, amelyet triplikátumokban vizsgáltunk.

4.7 Új generációs szekvenálás

Génkönyvtár készítéséhez, a szekvenálást (deep sequencing) az *UTMB Next-Generation Sequencing (NGS) Core Facility* intézetében, *Illumina HiSeq 1000 sequencing system* készülékkel végeztük, Aguilera-Aguirre, 2015 módszere szerint. A teljes RNS-ből (1 µg), a poly(A)⁺ RNS-t poly(T) oligo konjugált mágneses gyöngyökkel kisselektáltuk. A megkötött RNS-t 8 percig 94°C-on inkubálva fragmentáltuk 19,5 µl fragmentációs pufferben. Az első- és második szál szintézist, adapter kötődést és könyvtár amplifikációt *Illumina TruSeq RNA Preparation kit*-tel végeztük a gyártó utasításai szerint. A mintákat az adapterekbe épített *index tag*-ekkel követtük nyomon. A könyvtár minőségét Agilent DNA-1000 chip-pel, Agilent 2100 Bioanalyzer készülékkel vizsgáltuk. A könyvtár DNS templátok mennyiségi analízisét Q-PCR-rel és ismert méretű referencia standardokkal végeztük.

A DNS templátok klaszterekbe rendezéséhez, *TruSeq PE Cluster Kit version 3* és *Illumina cBot workstation*-t használtunk, a gyártó utasításainak megfelelően. A templát bemenetet úgy kalibráltuk, hogy azok 700-1000 K/mm² klasztersűrűséget érjenek el. A párosított végű szekvenálást egy *TruSeq SBS kit version 3* kit-tel, *Illumina HiSeq 1000* készüléken végeztük a gyártó útmutatása alapján. A nyers szekvencia adatokat CASAVA-1.8.2-vel konvertáltuk FASTQ fájljokká. A szekvencia adatokat, a *Bowtie2*, *Tophat* és *Cufflinks* programokkal analizáltuk, az NCBI (National Center for Biotechnology Information) egér (*Mus musculus*) genom referencia mm10 felhasználásával. Az RNA-seq adatok az NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) felületen lettek tárolva, és elérhetőek a GSE61095, valamint a GSE65031-es számon. *Reads per kilobase of transcript per million* (RPKM: illesztett leolvasások száma/a transzkript kilobázisban mért hossza)/a leolvasások teljes száma millióban kifejezve) értékek minden esetben, a hozzájuk tartozó kontrollokra lettek normalizálva. Annak érdekében, hogy megerősítsük a kiválasztott gének transzkripció szintjeit, egy *SABiosciences RTprofiler PCR Array assay*-t használtunk, a gyártó utasításainak megfelelően. A vizsgálatot SYBR® Green qRT-PCR-rel, egy ABI7000 Sequence Detector készüléken végeztünk. A génexpresszióban

történt változások meghatározására a $\Delta\Delta Ct$ módszert alkalmaztunk. A kalibrációhoz stimulálatlan sejteket használtunk, majd eredményeinket GAPDH-ra a normalizáltuk.

4.8 Gén ontológiai vizsgálatok

A teljes transzkriptomból készült hő térképeket és a hierarchikus klasztereket Morpheus online szoftverrel készítettük. A Venn diagramok készítéséhez a Venny 2.1 szoftvert használtuk. Az egér DS aktivációval bizonyítottan összeköthető gének listájának készítéséhez a Mouse Genome Informatics gén ontológiai böngészőjét (MGI), és a *Mouse Dendritic and Antigen Presenting Cell RT² Profiler PCR Array* génlistáját használtuk.

4.9 Géncsendesítési kísérletek

A frissen izolált monocitákat 3 μ M OGG1-specifikus siGENOME Smartpool, vagy nem target, kis interferáló RNS-sel (siRNS) elektroporáltuk Opti-MEM médiumban, 4 mm-es küvetákat alkalmazva *GenePulser Xcell* készülékkel. Az elektroporációt követően a sejteket a fentebb leírt módon tenyésztettük. A DS differenciáció második napján az IL-4-et és GM-CSF-et pótoltuk. Az OGG1 kifejeződési szinteket western blot-tal határoztuk meg a csendesítés ötödik napján.

4.10 Western blot analízis

A sejteket Laemmli pufferben lizáltuk. A fehérje mintákat SDS-PAGE gélen szeparáltuk, majd a proteinek nedves blot-tal átvittük nitrocellulóz membránra. A nem specifikus kötőhelyeket 5% zsírszegény tejport tartalmazó TBS-Tween (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) oldatban blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd egy éjszakán keresztül jelöltük 4°C-on OGG1-specifikus antitesttel (nyúl monoklonális antitest) vagy anti RIG-I és anti β -aktin primer antitestekkel. A primer antitestek detektálásához, a membránt torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (anti-nyúl vagy anti-egér) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A fehérje minták kimutatásához kemilumineszcens rendszert használtunk. A western blot filmeket beszkenneltük, majd denzitometráltuk Kodak 1D Image Analysis 3.6-os verziójú szoftver segítségével. A relatív denzitások meghatározásához az OGG1, RIG-I sávok intenzitását és a hozzájuk tartozó β -aktin sávok intenzitásának arányát használtuk.

4.11 A sejtek áramlási citometriás vizsgálata

Sejtfelszíni fehérje expressziók vizsgálatához a sejteket megjelöltük FITC-konjugált monoklonális CD40 és CD209 antitestekkel, PE-jelölt anti-CD14, anti-CD86 és anti-HLA-DQ, PE-Cy5-jelölt anti-CD83 és APC konjugált anti-CD1a és izotípus kontroll antitestekkel. A fluoreszcencia intenzitások méréséhez, FACS Calibur áramlási citométert használtunk. Az összes áramlási citometriás vizsgálatnál izotípus kontroll antitesteket használtunk a nem

specifikus háttér detektálására, a gyártó utasításainak megfelelően. A relatív fluoreszcencia intenzitás értékeket a specifikus antitest és nem specifikus izotípus kontrollok medián fluoreszcencia intenzitás arányával határoztuk meg. A sejtek életképességének vizsgálatához 7-aminoactinomycin D-vel (7-AAD) jelöltük 15 percig, majd fluoreszcencia intenzitásukat mértük. FACS Calibur áramlási citométerrel. Az adatok kiértékelését FlowJo szoftverrel végeztük.

4.12 A sejtek által szekretált citokin, kemokin, illetve tejsav szintek meghatározása

A sejtkultúra felülúszókat a megjelölt időpontokban összegyűjtöttük, az IL-6, TNF, IL-10 citokinek és az IL-8 kemokin koncentrációjának meghatározására humán ELISA kitéket használtunk. IFN- α és IFN- β szintek méréséhez, *VeriKine™ Human Interferon Alpha and Beta ELISA kit*-et használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A sejtek tejsav termelésének detektálásához *Glycolysis Cell-Based Assay Kit*-et használtunk. Abszorbancia értékek mérését, *Synergy HT microplate reader* készüléken végeztük, a citokinek és kemokin kimutatását 450 nm-en, a laktát assay-t pedig 490 nm-en végeztük.

4.13 Kvantitatív, valós idejű PCR

A teljes RNS izolátumokat 5×10^5 sejtől vontunk ki Tri reagenssel. Annak érdekében, hogy elkerüljük a genomi DNS amplifikációját, az RNS izolátumot DNáz I-gyel kezeltük, majd reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő. Ehhez *High Capacity cDNA RT Kit*-et használtunk. Az IFNB, hexokináz 2 (HK2), laktát dehidrogenáz A (LDHA), hipoxia indukált faktor 1-alfa (HIF1A) génexpressziós assay-eket a Thermo Fisher Scientific-től, míg az IFNA1 és PPIA (ciklofilinA) assay-eket az Integrated DNA Technologies-től szereztük be. A kvantitatív PCR-hoz *ABI StepOne Real-Time PCR System*-et használtunk. A ciklus küszöbértéket (C_T) a StepOne v2.1 Szoftver segítségével határoztuk meg. Az mRNS relatív értékét ($2^{-\Delta CT}$) minden esetben a PPIA háztartási génre normalizáltuk.

4.14 T sejt proliferációs assay

A CD8⁺ allogén T sejtekkel történő ko-kultúra összeállítása előtt a primer humán pDS-ek TLR9 aktiválását végeztük, melyhez CpG-A-val (1 μ M) stimuláltuk azokat 2-DG jelenlétében vagy nélküle 6 órán keresztül. Ezzel párhuzamosan, RIG-I expresszió indukálása miatt primer pDS-eket 16 óráig előkezeltük CpG-A-val (0,25 μ M). Alapos mosásokat követően, 6 órán keresztül specifikus RIG-I ligand 5'ppp-dsRNS-sel stimuláltuk őket 2-DG jelenlétében, vagy a nélkül. Ezt követően az aktivált DS-eket kétszer átmostuk médiummal, majd 96 lyukú, U-aljú plate-ekre helyeztük őket allogén naiv CD8⁺ T sejtekkel együtt 1:10 DS-T sejt arányban. A T-sejteket

előzőleg 5 napig 0,5 μ M carboxifluorescein szuccinimidil észterrel (CFSE) jelöltük, 1 μ g/ml anti-humán CD3 monoklonális antitest jelenlétében. A ko-kultúrában tenyésztést követően a CFSE festék fluoreszcencia intenzitását a BD FACS Calibur áramlási citométer FL1 (530 $\pm$ 15 nm) csatornáján detektáltuk. Az adatokat FlowJo szoftverrel értékeltük.

4.15 Statisztikai analízis

Statisztikai elemzéshez varianciaanalízist (ANOVA) használtunk, melyet Bonferroni post-hoc teszt követett. Két csoport összehasonlítása esetén Student félé párosítatlan t-tesztet végeztünk. Az adatok elemzéséhez GraphPad Prism v.6 szoftvert használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

5. Eredmények

5.1 Az exogén 8-oxoG veszély szignál lehet a dendritikus sejtek számára

5.1.1 A 8-oxoG-nal történő intranazális kezelés a DS funkciókhoz köthető gének expressziójának megváltozását váltja ki egerekben

Nemrégiben írták le az OGG1-BER folyamatoknak az egér tüdő teljes transzkriptomra gyakorolt hatását. Annak érdekében, hogy az OGG1-mediált 8-oxoG képződést modellezzék a légutakban, egereket 8-oxoG-nal - az OGG1-BER specifikus termékével - kezeltek intranazálisan. Az egerek egyszeri kezelést kaptak, vagy többszöri 8-oxoG kezeléseken estek át a 0., 2. és 4. napon. Ezt követően az egér tüdőkből RNS-t izoláltak 0, 30, 60 vagy 120 perccel az egyszeres kezelés után, vagy többszöri kezelés esetén, ugyanilyen időpontokban az utolsó kezelését követően. Az RNS mintákat összegyűjtötték, majd megszekvenálták. Az egyszeri kezeléssel mintákból összesen 23 337 transzkriptot, míg a többszörös kezeléssel mintákból 18 678 transzkriptot azonosítottak (GEO Series elérési szám GSE61095 és GSE65031). Jelen kísérleteink során megvizsgáltuk az OGG1-BER folyamat hatását a tüdő DS-ek funkcióihoz köthető gének kifejeződésére. Ennek kivitelezéséhez egy online adatbázisból (MGI) és korábban publikált irodalmi adatok alapján egy listát állítottunk össze az egér DS-ek aktivációjában bizonyítottan közreműködő génekről. Az egyszeri és ismételt 8-oxoG kezelésekből nyert RNS szekvenálási adatokat összevetettük a listánkba beválasztott génekkel. Az egyszeri 8-oxoG kezelést követően a DS aktivációhoz és funkcióhoz köthető 95 génből 22 volt, amelyeknek az expressziója szignifikánsan megváltozott. A többszöri kezelések az egyszeri kezeléshez viszonyítva sokkal markánsabb változásokat okoztak, a listában szereplő 95 génből 42-nek az expressziója változott szignifikánsan. Az egyszeri 8-oxoG expozíciót követően a jelentősen megváltozott kifejeződésű gének száma közel azonos volt a három mintavételi időpontban, míg a többszöri kezeléseknél a maximális változás a 60. percnél volt megfigyelhető, és a 120. percnél nem tapasztaltunk további növekedést. A 8-oxoG expozíció után a különböző időpontokban az egyszeri kezelés, vagy a többszöri kezelések után, illetve a mindkét típusú kezelést követően szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének számát Venn-diagramon mutatjuk be. A legnagyobb mértékű változás a kifejeződött gének számában a többszöri kezelést követő 60. percnél volt megfigyelhető, ahol 22 egyedi és 12, az egyszeri kezeléssel átfedő gén expressziója változott meg szignifikánsan. Annak ellenére, hogy a kiválasztott 95 gén közül egyik sem kizárólagosan az egér tüdőben található DS-ekben fejeződik ki, ezek a megfigyelések felvetik annak a lehetőségét, hogy az OGG1-BER hozzájárulhat a DS-ek aktivációjához.

5.1.2 Az intranazális OVA-nal együtt adott 8-oxoG fokozza az OVA-specifikus IgE termelődését

Korábban már kimutatták, hogy az OVA kezelés adjuváns használata nélkül is képes egerekben IgE-mediált allergiás légúti gyulladást kiváltani. Mi is ezt a modellt alkalmaztuk, hogy megvizsgáljuk az OGG1 általi DNS BER folyamatok immunmoduláló hatását. Ahogy azt már leírták, az ismételt intranazális OVA kezelések hatására, az OVA-specifikus IgM és IgE antitestek szérumszintjei szignifikánsan megemelkedtek. Amikor az OVA-t 8-oxo-G-nal kombinációban alkalmaztuk, a kezelés az OVA-specifikus IgM termelődést csak kis mértékben, míg az OVA-specifikus IgE termelést szignifikánsan tovább fokozta. Azon megfigyelések alapján, hogy a DS-ek általi antigén prezentáció elengedhetetlen a follikuláris segítő T sejtek (Tfh sejtek) differenciációjának beindításához, és a Tfh sejtek fontos szerepet töltenek be a légúti allergének elleni immunválaszok során létrejövő IgE antitestek termelődésében, eredményeink alátámasztják, hogy a 8-oxoG kiválthatja az egér légúti DS-ek aktiválódását.

5.1.3 Az exogén 8-oxoG megváltoztatja a humán moDS-ek fenotípusát, valamint citokin és kemokin termelésüket

Az egér kísérletekből kapott eredmények alapján megvizsgáltuk, hogy a humán moDS-ekre milyen hatással lehet a 8-oxoG kezelés. Ennek vizsgálatához éretlen moDS-eket növekvő koncentrációjú 8-oxoG-nal (1, 10, 100 μ M) kezeltünk, majd áramlási citometriával megvizsgáltuk a CD40 és CD86 ko-stimulációs molekulák, a CD83 érési marker, valamint a HLA-DQ antigén prezentáló molekula kifejeződésének szintjét. Habár többnyire csak a nagyobb alkalmazott koncentrációknál (10 - 100 μ M), de az exogén 8-oxoG hatására szignifikánsan fokozódott az aktivációval, valamint éréssel összefüggő sejtfelszíni molekulák kifejeződése. A 8-oxoG humán moDS-ekre gyakorolt hatásának további vizsgálatához, az moDS-eket 1, 10, és 100 μ M 8-oxoG-nal kezeltük 24 órán keresztül, majd a sejtek felülúszójából ELISA módszerrel meghatároztuk az IL-6, TNF- α és IL-10 citokinek, valamint az IL-8 kemokin koncentrációját. A 8-oxoG kezelés koncentráció-függő módon fokozta a gyulladásos IL-6 és TNF- α citokinek, valamint az IL-8 kemokin mennyiségét, azonban az anti-inflammatorikus IL-10 termelésére nem volt hatással. Eredményeink alapján, az exogén 8-oxoG képes beindítani a humán moDS-ek aktivációját és érését, fokozza a sejtfelszíni antigén prezentációs, ko-stimulációs molekulák kifejeződését, valamint a sejtek a gyulladásos és kemotaktikus faktor termelését.

5.1.4 A humán moDS-ek 8-oxoG általi aktiváláshoz szükséges az OGG1 kifejeződése

Annak bizonyítására, hogy az OGG1 szerepet játszik a humán moDS-ekben végbemenő, 8-oxoG által indukált fenotípusos és funkcionális változásokban, specifikus siRNS-sel csendesítettük a sejtek OGG1 expresszióját. A csendesítés hatékonyságát western blot analízissel ellenőriztük. Az OGG1 specifikus siRNS ~80%-kal csökkentette a moDS-ekben az OGG1 expresszióját, a kezeletlen kontrollhoz és a kontroll siRNS kezeléshez képest. Megvizsgáltuk 7-AAD festéssel a kezeléseknél a sejtek életképességére gyakorolt hatását is. Kiderült, hogy a 7-AAD negatív, azaz életképes sejtek aránya közel 100% volt mind a negatív kontroll, mind pedig az OGG1-specifikus siRNS-sel kezelt sejtek esetében, tehát az siRNS kezelés nem befolyásolta a sejtek életképességét.

A differenciáció 5. napján az OGG1-csendesített, éretlen moDS-ek a kezeletlen sejtekhez hasonlóan, alacsony CD14, valamint magas CD209 és CD1a expressziót mutattak, és normál DS-re jellemző fenotípussal rendelkeztek. Mindemellett sem a CD86 és CD83 aktivációs markerek kifejeződése, sem pedig az IL-6 és IL-8 gyulladásos mediátorok termelődése nem változott. Ezek a megfigyelések alátámasztották, hogy az OGG1 gátlása nem változtatja meg az moDS-ek differenciációját, valamint érési folyamataikat. A következő lépésben a 8-oxoG által kiváltott hatások OGG1 függését vizsgáltuk. Ehhez az előző kísérletekben is alkalmazott koncentrációjú 8-oxoG-nal (10 μ M és 100 μ M) kezeltük az OGG1-csendesített moDS-eket. A kontroll siRNS-sel kezelt sejtekhez képest, az OGG1 csendesítése szignifikánsan csökkentette a 8-oxoG CD86 és CD83 kifejeződést fokozó, valamint az IL-6 citokin és az IL-8 kemokin termelődést növelő hatását. Ezek a megfigyelések alátámasztják hipotézisünket, miszerint az exogén 8-oxoG bázis OGG1-függő módon aktiválhatja a humán DS-eket.

5.2 Az egyes humán dendritikus sejt altípusok eltérő anyagcsere változásokon mennek át a RIG-I-mediált aktivációjukat követően

5.2.1 A plazmacitoid DS-ek és a moDS-ek eltérő RIG-I expressziós profillal rendelkeznek

A pDS-ek korlátozott száma miatt a kísérleteink nagy részét GEN2.2 humán pDS sejtvonalon végeztük el. Ezek a sejtek fenotípusosan és funkcionálisan is nagymértékben hasonlítanak a primer humán pDS-ekhez. Főbb megfigyeléseinket egészséges donorokból izolált, primer humán pDS-eken validáltuk. Ezek mellett perifériás vérből izolált monocitákból *in vitro* differenciáltatott moDS-eket is használtunk, amelyek ideális modell sejtek a DS-ek funkcionális vizsgálatára. Először megvizsgáltuk a DS altípusokban a RIG-I expresszióját. Korábban már leírtuk, hogy a GEN2.2 sejtek TLR-9 agonista CpG-A kezelést követően

expresszálják a citoszolikus RIG-I receptort. Nyugalmi állapotban a GEN2.2-höz hasonlóan, a primer pDS-ekben is nagyon alacsony szinten expresszálódik a RIG-I, azonban CpG-A expozíciót követően szignifikánsan fokozódik a kifejeződése. Ezzel ellentétben a moDS-ekben a differenciációjuk során fokozatosan megjelenik a RIG-I és az 5 napos éretlen moDS-ekben már stabil marad a kifejeződése. Ezen megfigyelések alapján ez a két - a RIG-I-et eltérően kifejező - DS altípus potenciális modellként használható a RIG-I-indukált metabolikus változások tanulmányozására.

5.2.2 A glikolízis gátlása hatással van a GEN2.2 sejtek életképességére, valamint a RIG-I kifejeződésére

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a DS-ek TLR-általi aktivációja a metabolizmusuk megváltozásával jár együtt. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a glikolízisnek a pDS-ek aktivációjában játszott szerepét, a sejteket glikolízist gátló 2-deoxi-D-glükózzal (2-DG) kezeltük. Első lépésként beállítottunk egy olyan optimális 2-DG koncentrációt, amelyet a GEN2.2 sejtek még toleráltak. Eredményeink szerint, az alacsony dózisú 2-DG nem (1-5 mM) vagy csak kis mértékben (10 mM) befolyásolta a sejtek életképességét, míg a nagyobb dózisok (20-50 mM) már szignifikánsan nagyobb mértékű sejthalált váltottak ki a kezeletlen sejtekhez képest. További kísérleteinkhez az 1, 5 és 10 mM-os 2-DG-t választottuk ki, melyek nem növelték jelentősen a 7-AAD pozitív sejtek arányát a sejttenyészetekben.

A glikolízis gátlás RIG-I expresszióra gyakorolt hatását megvizsgálva, kísérleteinkből kiderült, hogy az 1 és 5 mM koncentrációjú 2-DG nem befolyásolta a GEN2.2 sejtek CpG-A-indukált RIG-I expresszióját, míg a 10 mM-os koncentráció szignifikáns csökkenést okozott. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a pDS-ekben a RIG-I expresszióját a glikolízis szabályozza.

5.2.3 A TLR-stimuláció következtében kialakuló I-es típusú IFN válasz függ a glikolízistől, míg az RLR-által kiváltott IFN termelés független attól a GEN2.2 sejtekben

Munkacsoportunk már korábban leírta, hogy a virális nukleinsav felismerését követően, a pDS-ekben az I-es típusú IFN termelés két hullámban zajlik. Az endoszómális TLR-ek a korai I-es típusú IFN termeléshez járulnak hozzá, míg a TLR stimuláció által indukált citoszolikus RLR-ek inkább a késői típusú IFN választ támogatják. Jelen vizsgálataink arra irányultak, hogy kiderítsük a glikolízis szerepét a humán pDS-ekben az I-es típusú IFN termelés első, illetve második hullámában. A GEN2.2 sejteket először 1 μ M CpG-A-val, egy TLR9 ligandummal, kezeltünk, hogy korai I-es típusú IFN választ váltsunk ki. A CpG-A-indukált IFN- α és IFN- β expresszió mind mRNS, mind fehérje szinten szignifikánsan csökkent, amikor a sejteket 2-DG-zal kezeltük. A következő kísérletben megvizsgáltuk a kulcsfontosságú glikolitikus gének

expresszióját mRNS szinten a CpG-A-val kezelt GEN2.2 sejtekben. Azt találtuk, hogy az *LDHA*, *HK2* és *HIF1A* gének kifejeződése szignifikánsan fokozódott a kontroll mintákhoz képest. Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a GEN2.2 sejtekben az endoszomális TLR9 stimulációt követő I-es típusú IFN termeléshez szükség van glikolízisre. Ezekből a megfigyelésekből kiindulva felmerült bennünk a kérdés, hogy vajon a RIG-I stimuláció általi pDS aktivációt is kíséri-e glikolitikus váltás. Ennek vizsgálatához a GEN2.2 sejteket előkezeltük alacsony koncentrációjú CpG-A-val, így kiváltottuk a RIG-I citoszolikus expresszióját, majd a sejteket RIG-I-specifikus agonistával, 5'ppp-dsRNS-sel kezeltük. Azt is megfigyeltük, hogy a TLR9 aktivációval ellentétben az 5'ppp-dsRNS-sel aktivált pDS-ekben nem növekedett sem a laktát termelés, sem pedig a glikolízishez kapcsolódó gének expressziója. Ezek az eredmények felvetik, hogy a RIG-I-mediált I-es típusú IFN válaszok nem glikolízis függőek, hanem más metabolikus útvonal biztosítja a kései I-es típusú IFN szekrécióhoz szükséges energiát.

5.2.4 A TLR-indukált I-es típusú IFN válasz függ a glikolízistől, míg a RIG-I-által kiváltott IFN termelés független attól a primer humán pDS-ekben is

A sejtvonalon kapott eredményeink megerősítésére elvégeztük kísérleteinket primer humán pDS-eken is. Az így kapott eredményeink összhangban állnak a GEN2.2 sejtvonalon tapasztalt megfigyeléseinkkel. Míg a primer humán pDS-ek IFN- α és IFN- β termelése a CpG-A stimulációt követően csökkent 2-DG jelenlétében, addig a RIG-I-mediált IFN- α és IFN- β termelést a glikolízis inhibitora inkább fokozta. Mindezek mellett, a CpG-A-stimulált sejtek felülszójában megnövekedett laktát szinteket lehetett detektálni, amit a 2-DG-zal történő együttes kezelés szignifikánsan csökkentett. Ezzel ellentétben, a RIG-I stimulált pDS-ekben nem volt megfigyelhető a laktát szintek változása, ami azt jelzi, hogy a RIG-I aktivációt követően a primer humán pDS-ek sem a glikolízist használják a makromolekuláik/fehérjék szintéziséhez, hanem másik metabolikus útvonalat.

5.2.5 A glikolízis nélkülözhetetlen a RIG-I-indukált I-es típusú IFN termeléshez moDS-ekben

Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a megfigyeléseink a humán pDS-ekre specifikusak-e, kísérleteinket éretlen moDS-ekkel is elvégeztük. Ezek a sejtek nyugvó állapotban is folyamatosan expresszálják a RIG-I-et. Először megvizsgáltuk a 2-DG hatását a moDS-ek életképességére. Eredményeink szerint a pDS-ekhez képest, a moDS-ek mindegyik koncentrációban (1-50 mM) tolerálták a 2-DG-t, azonban a könnyebb összehasonlíthatóság érdekében, a további kísérleteinkben is a pDS-eknél használt (1, 5 és 10 mM) 2-DG koncentrációkat alkalmaztuk.

A következő lépésben megvizsgáltuk a RIG-I stimulációt követően kialakuló IFN- α és IFN- β válaszok kinetikáját. Az I-es típusú IFN gének mRNS szintű kifejeződése a stimulust követően 12 órával érte el a maximális értéket, ezért a glikolízis hatásait is ebben az időpontban vizsgáltuk. Ezt követően ellenőriztük a 2-DG hatását a RIG-I stimulációt követő IFN- α és IFN- β expresszióra. Azt észleltük, hogy a stimulációt követően, a glikolízis gátlása esetén, az I-es típusú IFN gének kifejeződése mRNS, valamint fehérje szinten is csökkent. A moDS-ek által termelt laktát mennyisége és a kulcsfontosságú glikolitikus gének (*LDHA*, *HK2* és *HIF1A*) expressziós szintjei szintén megemelkedtek RIG-I stimulust követően, ami fokozott glikolitikus aktivitásra utal.

5.2.6 A glikolízis fokozódása szükséges a TLR9-stimulált primer humán pDS-ek és a RIG-I-aktivált moDS-ek által indukált allogén, naív T sejtek proliferációjához

A nyugvó DS-ek aktiválódása metabolikus változásokat is kivált, amelyek befolyásolhatják a T-sejt aktiváló képességüket. Ezért vizsgálataink során tanulmányoztuk, hogy a DS-ek anyagcsere változásai milyen hatással vannak a T-sejt aktiváló képességekre. Ehhez nagy tisztaságú, allogén, naív CD8⁺ T sejteket primer humán pDS-ekkel, vagy moDS-ekkel tenyésztettünk együtt. Előzőleg a pDS-eket CpG-A-val, vagy 5'ppp-dsRNS-sel, az moDS-eket pedig szintén RIG-I liganddal kezeltük 6 órán keresztül 5 mM 2-DG jelenlétében, vagy anélkül. Eredményeink szerint a CpG-A-val kezelt pDS-ek erős T-sejt proliferációt indukáltak, amely 2-DG-vel gátolható volt. A RIG-I-stimulált pDS-ek szintén erőteljes T-sejt proliferációt okoztak, itt azonban a 2-DG kezelés nem volt hatással a T-sejt proliferációra. Hasonlóan a pDS-ek CpG-A kezeléséhez, a moDS-ek specifikus RIG-I ligandummal való aktiválása fokozta a T-sejt proliferációt kiváltó képességüket, amelyet a 2-DG kezelés szignifikánsan csökkentett. Megfigyeléseink alapján feltételezzük, hogy a glikolízis a CpG-A által aktivált pDS-ekben és a RIG-I által stimulált moDS-ekben nélkülözhetetlen a CD8⁺ T-sejtek aktivációjának indukálásában, azonban a RIG-I-mediált módon stimulált pDS-ek T-sejtaktiváló képességére nincs hatással.

6. Megbeszélés

Az immunrendszer őrszemeiként a DS-ek folyamatosan pásztázzák a mikrokörnyezetüket, melyből mintákat gyűjtve a perifériás védelmi rendszer kulcsfontosságú, egyik első vonalát képezik. Elfogják, feldolgozzák, majd felszínükön bemutatják a különböző antigéneket. A környezeti vagy a belső eredetű stimulust követően a DS-ek - más sejtekkel együtt - részt vesznek a gyulladásos válaszok elindításában is.

Az oxidatív stressz következtében termelődő mediátorok, illetve a kialakuló módosult molekulák biológiai hatását egyre szélesebb körben kutatják. A környezetből származó és a tüdőbe bejutó oxidatív ágensek által kiváltott oxidatív stressz képes növelni nemcsak a tüdő rezidens sejtek és a keringő vérsejtek DNS-ének 8-oxoG szintjeit, hanem a különböző testfolyadékok 8-oxoG koncentrációját is

Egy nemrégiben publikált tanulmányban megvizsgálták az OGG1-BER hatását az egér tüdő transzkriptomra. Az egereket szabad 8-oxoG bázissal intranazálisan kezelték, majd új generációs RNS szekvenálással megvizsgálták a tüdőben lezajló génexpressziós változásokat. A transzkriptom analízise rávilágított, hogy mind az egyszeri, mind a többszörös 8-oxoG kezelés fokozta olyan több biológiai folyamatot befolyásoló gének kifejeződését, valamint több kemokin, citokin, interleukin, illetve jelátviteli molekulák expresszióját is fokozta, amelyek a gyulladásos folyamatokban jelentős szerepet játszanak. Ezek között az exogén 8-oxoG által módosított expressziójú gének között számos olyan lehet, amely befolyásolhatja a DS-ek funkcióját, így hozzájárulhat az oxidatív stresszel összefüggő gyulladásos válaszok kialakulásához. Ebből kiindulva, online adatbázisokat és irodalmi adatokat felhasználva kiválasztottunk 95 olyan gént, melyek bizonyítottan szerepet játszanak a DS-ek működésében. A korábbi transzkriptom elemzés adatait felhasználva megnéztük, hogy az egyszeri, illetve a többszörös 8-oxoG kezelések milyen hatással voltak ennek a 95 génnek az expressziójára. Azt találtuk, hogy egyszeri kezelés hatására a gének mindössze kis részének kifejeződése változott meg jelentősen (22 a 95-ből). Ez nem meglepő az alapján, hogy a DS-ek aránya nagyon alacsony (körülbelül 1%) a tüdő összes sejtjéhez viszonyítva. Ennek ellenére, több olyan gén expressziója is fokozódott, melyek a DS-ek funkciójához köthetők mind a veleszületett, mind pedig a szerzett immunválaszok során.

A DS-ek általi antigén prezentáció szükséges a naív T limfociták aktiválásához, az effektor T sejtek, így a Tfh sejtek differenciálódásának elindításához is. A Tfh sejtek segítik a B sejtek differenciálódását és az izotípus váltást. Kísérleteinkben a DS-ek kis számára való tekintettel az exogén 8-oxoG DS-aktiváló hatását indirekt módon vizsgáltuk egy adjuváns mentes OVA modellben. A DS-ek aktiválódására a szérumban megjelenő allergén-specifikus immunglobulinok mennyiségének meghatározásából következtettük. Megfigyeléseink szerint a 8-oxoG és OVA együttes alkalmazása szignifikánsan megnövelte az OVA-specifikus IgE termelődését az egerekben. Ez összhangban van azzal a nemrégiben publikált kutatási eredménnyel, hogy a Tfh sejtek nélkülözhetetlen szerepet játszanak a belélegzett allergénekre specifikus IgE izotípusú antitestek termelődésében.

Az állatkísérletek során kapott eredményeink humán relevanciájának vizsgálatához humán moDS-eket kezeltünk 8-oxoG-nal *in vitro* körülmények között. Kísérleteink során a 8-oxoG

kezelés egymagában képes volt a moDS-ek aktiválására, amit a sejt felszíni érési, ko-stimulációs és antigén prezentáló molekulák kifejeződésének fokozódása, illetve a megnövekedett gyulladásos citokin termelés is alátámasztott.

Nemrégiben kimutatták, hogy a 8-oxoG az OGG1-gyel komplexet képezve kis molekulású GTPázok aktivációját és ezzel többféle jelátviteli útvonal beindítását képes kiváltani a sejtekben. A kis molekulású GTPázoknak számos DS funkció, mint a differenciáció, endocitózis, érés, kemotaxis, antigén prezentáció, keresztprezentáció, T-sejt polarizáció szabályozásában is szerepük van. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a humán DS-ek olyan molekuláris jelátviteli hálózattal rendelkeznek, melyek szerepet játszhatnak a 8-oxoG-OGG1 komplex által kiváltott gyulladásos válaszok mediálásában.

Ennek bizonyításaként kimutattuk, hogy a moDC-k 8-oxoG általi aktivációja teljesen megszűnik, ha az OGG1 kifejeződését gátoljuk a sejtekben. Feltételezhető, hogy az OGG1 csökkent expressziója esetén kevesebb 8-oxoG-OGG1 komplex alakul ki a DS-ek citoplazmájában, így csökken a kis GTPázok által mediált útvonalak aktiváltsága is. Egy másik lehetséges mechanizmus, hogy az OGG1 hiány következtében csökkent NF- κ B-nek a promóter szekvenciákhoz való kötődése, ami a DS-ek kisebb mértékű aktiválódásához vezet. Ez a feltételezés azon alapul, hogy oxidatív stressz során a duplaszálú DNS-ben lévő szubsztrátjához kötődő OGG1 epigenetikus szabályozóként működik. Mivel, kísérleteink során az exogén 8-oxoG nem okozott oxidatív stresszt a humán moDS-ekben, illetve nem növekedett a DNS-ben az 8-oxoG mennyisége, így kizárható, hogy az OGG1 fokozottan kötődött volna a promóter szekvenciákhoz, így fokozva a gének expresszióját. Kísérleteink során minden esetben frissen készített 8-oxoG oldatokat használtunk, melyről különböző sejt kultúrákon kimutatták, hogy oxidációs szempontból inerként viselkednek.

Az OGG1-nek fontos szerepe van a genom integritásának fenntartásában, ám emellett az enzim működését több gyulladásos betegséggel is összefüggésbe hozták. Az OGG1 mediált jelátvitel például fokozza az allergiás gyulladás intenzitását, míg az OGG1 gén polimorfizmusa kapcsolatban van a rheumatoid arthritis progressziójával. Jelen eredményeink rávilágítanak, hogy az OGG1-BER mechanizmusnak fontos szerepe van a DS aktivációban is. A DS-ek központi szerepet töltenek be mind a gyulladásos válaszok beindításában, mind a veleszületett és az adaptív immunválaszok összekötésében, ezért az immunterápiák fontos célpontjai. Eredményeink alapján, az OGG1 aktivitásának átmeneti és specifikus csökkentése a DS-ekben, csökkentheti a gyulladásos betegségek súlyosságát.

Ma már egyre több bizonyíték van arra, hogy az immunsejtek, stimulációt követően metabolikus váltáson mennek keresztül. Ennek a folyamatnak nélkülözhetetlen szerepe van az

aktiváció hiánytalan és teljes lezajlásában. Különösen igaz ez a TLR agonisták hatására, aminek következtében a cDS-ek és a moDS-ek OXPHOS-ból glikolízisre váltanak. Ennek gátlása megakadályozza aktivációjukat és hatással van az életképességükre is. Az irodalomban kevés információ van a pDS-ek metabolizmusa és az RLR jelátvitel közti kapcsolatról, így kísérleteinkben elsősorban a RIG-I stimulált humán pDS-ek anyagcsere profilját vizsgáltuk.

Legelőször tumorsejtekben írták le, hogy normoxiás körülmények mellett is OXPHOS-ról glikolízisre váltanak, hogy kielégíthessék a növekedésükhöz szükséges energiaigényüket. Ezt a jelenséget ma Warburg mechanizmusnak nevezzük. Feltételezzük, hogy a T sejtekben is hasonló folyamatok zajlanak le proliferációjuk és effektor sejtekké differenciálódásuk során. Ezzel ellentétben, a veleszületett immunitás sejteinél, beleértve a makrofágokat és a DS-eket is, a Warburg mechanizmus a funkcionális változásokat, mint például a citokin termelést segíti. A glikolízis fontos szerepét a TLR mediált DS aktiváció során először Jantsch és munkatársai figyelték meg. Leírták, hogy az egér csontvelő eredetű dendritikus sejtek (BM-DS-ek) TLR4 mediált aktivációjának fontos szabályozó molekulája a HIF-1 α . Jelenlegi tudásunk szerint, eddig csak egy tanulmányban vizsgálták a sejtek metabolizmusa és az RLR mediált jelátvitel közti kapcsolatot. A szerzők különböző sejtvonalakat használtak (például: HEK293, MEF, J774A.1), melyeket RIG-I-t kódoló plazmiddal transzfektáltak. Ezekben a sejtekben a vírusfertőzést követően, az RLR mediált antivirális válaszok kialakulásához szükség volt az OXPHOS aktivitására.

Ezzel a megfigyeléssel összhangban, mi is azt találtuk, hogy a pDS-ekben a RIG-I-on keresztüli aktivációt nem követi a glikolízis fokozódása. Sőt, a humán pDS-ekben a RIG-I mediált I-es típusú IFN termelés növekedett a 2-DG alkalmazásakor. Megfigyeléseink alátámasztják a Yoshizumi és munkatársai által leírtakat, miszerint az OXPHOS CCCP-val történő gátlása megzavarja az RLR mediált jelátvitelt a HEK293 sejtekben. Azt is megfigyeltük, hogy az OCR enyhe növekedést mutatott a RIG-I stimuláció során, ami további bizonyítékként szolgál arra, hogy a RIG-I stimulált humán pDC-k az OXPHOS-t használják funkcióik ellátásához.

Érdemes megjegyezni, hogy a kis mennyiségű CpG-A-val kiváltott RIG-I indukció nem okoz a pDS-ekben I-es típusú IFN termelést, azonban kialakíthatja a metabolizmus glikolízis irányú elmozdulását. Ennek ellenére, eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a glikolízis fokozódása csak átmeneti lehet és a pDS-ekben RIG-I stimuláció hatására az OXPHOS aktivitása fokozódik.

Humán moDS-eken végzett vizsgálatok igazolták, hogy az éretlen és tolerogén moDS-ek metabolikus profilját OXPHOS, zsírsav oxidáció és glikolízis jellemzi, míg az érett moDS-ekben a glikolízis fokozottabb, melyet erőteljesebb laktát termelésük is tükröz. Ellentétben az érett egér BM-DS-eken megfigyeltekkkel, ahol a váltás az OXPHOS teljes mértékű

blokkolásához vezet, így az energiatermelés és a sejtek túlélése teljes mértékben a glikolízistől függ, az érett humán moDS-ekben egy kismértékű OXPHOS aktivitást továbbra is megmarad, amely energiát szolgáltat számukra. Megfigyeléseinkkel összhangban, a szerzők úgy találták, hogy 50 mM 2-DG a sejtek életképességének csak enyhe csökkenését eredményezte, ami a túléléshez szükséges nagyfokú metabolikus alkalmazkodóképességre utal. Érdekes módon, a glikolízis blokkolása - a moDS-ekkel ellentétben - a pDS-ekben fokozta a RIG-I által kiváltott I-es típusú IFN termelést. Korábban már leírtuk, hogy a fokozott mtROS szint segíti a pDS-ek RIG-I mediált válaszkészségét, így feltételezzük, hogy a RIG-I ligandummal és glikolízis inhibitorral együttesen kezelt pDS-ek megnövekedett I-es típusú IFN termelése mögött is ez a jelenség állhat.

Korlátozott mennyiségű adat áll rendelkezésre arról, hogy milyen hatása van az anyagcserének az emberi DS-ek T-sejt aktiváló képességére. Korábban kimutatták, hogy az egér DS-ek *in vivo* aktivációja 2-DG jelenlétében gátolja azok CD4⁺ és CD8⁺ T-sejt stimuláló kapacitását, ami bizonyítja a TLR kiváltott glikolízis fontosságát a DS-ek T-sejt aktiváló képességében. A mi kísérleti eredményeink is arra utalnak, hogy a glikolitikus anyagcserének nélkülözhetetlen szerepe van a TLR9 által aktivált humán pDS-ek és a RIG-I stimulált moDS-ek T-sejt aktivációjában. Érdekes módon, a 2-DG kezelés nem volt hatással a RIG-I stimulált pDS-ek allogén CD8⁺ T-sejt aktiváló képességére. Ezek az eredmények felvetik, hogy kapcsolat van a különböző DC altípusok adaptív immunválaszt elindító képessége és az eltérő anyagcsere igényeik között.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a különböző DS altípusok, mint a humán pDS-ek és a moDS-ek eltérő anyagcsere igényekkel rendelkeznek. RIG-I stimulációt követően a moDS-ek glikolízisre váltanak, míg a pDS-ek inkább az OXPHOS-ra hagyatkoznak. Ezeket a különbségeket a két DS altípus különböző virális szenzor repertoárja magyarázhatja, mely különböző antivirális választ eredményez. A pDS-ek inkább endoszómális TLR-eket használnak a vírus fertőzés korai fázisában, míg a RIG-I-t antivirális válaszuk későbbi szakaszában fejezik ki. Ezzel ellentétben a moDS-ek mind TLR-eket, mind pedig RLR-eket használnak a vírussal történő találkozásuk során. Feltételezzük, hogy az endoplazmatikus retikulum és a Golgi-apparátusok növekedése, valamint az ezekben lezajló nagy mennyiségű antivirális fehérje termelése érdekében szükséges a fokozott glikolitikus aktivitás. Eredményeink alapján, a DS-ek anyagcseréjének manipulálásával ezeknek a sejteknek az immunpolarizáló tulajdonságait is módosíthatjuk.

7. Új eredmények

- A 8-oxoG-nal történő intranazális kezelés számos, a DS funkciókhoz köthető gén expresszióját megváltoztatja az egerek tüdejében.
- *In vivo* egérmodellben kimutattuk, hogy az allergénnel együtt adott intranazális 8-oxoG fokozza az allergén-specifikus IgE ellenanyagok termelődését.
- Az exogén 8-oxoG OGG1 függő módon aktiválja a humán moDS-eket. Fokozza a sejtfelszíni érési, ko-stimulációs és antigén prezentáló molekulák kifejeződését, valamint növeli a citokin és kemokin termelésüket.
- Kimutattuk, hogy a humán pDS-ekben a TLR aktivációt követő I-es típusú IFN válasz függ a sejtek glikolitikus aktivitásától.
- Megfigyeléseink szerint a humán pDS-ek RLR-által kiváltott I-es típusú IFN termelése független a glikolízistól.
- A TLR9 stimulált humán pDS-ekben, valamint a RIG-I által aktivált moDS-ekben fokozott glikolitikus aktivitás szükséges ahhoz, hogy el tudják indítani az allogén, naív T sejtek proliferációját.

8. Összefoglalás

Egyre több bizonyíték van arra, hogy a reaktív oxigéngyökök (ROS) megemelkedett szintje a légutakban képes aktiválni a dendritikus sejteket (DS-eket), a pontos mechanizmus azonban még nem tisztázott. Túlzott mennyiségben a ROS módosíthatja a makromolekulákat, így a DNS-t is. Az egyik leggyakoribb DNS bázis károsodás a 7,8-dihidro-8-oxoguanin (8-oxoG) kialakulása, amelyet a 8-oxoguanin DNS glikoziláz 1 (OGG1) által elindított bázis excíziós repair (BER) mechanizmus (OGG1-BER) javít ki. Nemrégiben derült ki, hogy az OGG1 az oxidált purinok javításában betöltött szerepemellett guanin-nukleotid cserélő faktor aktivitással is rendelkezik, ha 8-oxoG-nal komplexet képez. Ebben a munkában közvetett bizonyítékokat szolgáltatunk arról, hogy az OGG1-BER specifikus termékének, a 8-oxoG-nak való kitettség a DC-k funkcionális változásait indukálja az egerek tüdejében. Bemutatjuk, hogy a humán monocita eredetű DS-k (moDS-ek) 8-oxoG-nal való kezelése a sejtfelszíni molekulák (CD40, CD86, CD83, HLA-DQ) fokozott expresszióját eredményezi, és növeli a gyulladásos citokinek és kemokinek szekrécióját. Az OGG1 siRNS általi csendesítése megszünteti a 8-oxoG aktiváló hatását a humán moDS-ekre.

Számos megfigyelés szerint a DS-ek Toll-szerű receptor (TLR)-mediált aktiválása gyors glikolízis indukcióval jár; azonban a retinsavval indukálható gén I (RIG-I) receptor szignalizációjának metabolikus követelményei kevésbé ismertek. A vírusok érzékeléséhez és a korai I-es típusú interferon (IFN) válasz kialakításához a plazmacitoid DS-ek (pDS-ek) endoszomális TLR-eket használnak, míg a konvencionális DS-ek (cDS-ek) citoszolikus RIG-I receptort alkalmaznak, amely konstitutív módon jelen van bennük. Korábban kimutattuk, hogy a TLR aktiválás a RIG-I kifejeződését indukálja a pDS-ekben, ami hozzájárul az I-es típusú IFN válaszok késői fázisához. Jelen munkánkban igazoltuk, hogy a humán pDS-ek TLR9 általi aktiválása metabolikus váltást eredményez és glikolízist indukál, ami szükséges az I-es típusú IFN-ok termeléséhez. Ezzel szemben a pDS-ek RIG-I által kiváltott antivirális válaszaik függetlenek a glikolízistől, inkább az oxidatív foszforilációra támaszkodnak. Eredményeink szerint, a glikolízist gátló 2-dezoxi-D-glükóz (2-DG) jelenlétében csak akkor csökkent a pDS-ek allogen, naív CD8⁺ T sejtek proliferációját kiváltó képessége, ha a pDS-ek előzetes aktivációja TLR9- és nem RIG-I-mediált módon történt. Érdekes módon a humán moDS-ekben - szemben a pDS-ekkel - a RIG-I által kiváltott válaszok glikolízis-függő módon alakulnak ki. Vizsgálatunkban elsőként sikerült kimutatnunk, hogy a RIG-I által kiváltott metabolikus változások inkább sejttípus-specifikus és nem receptor-specifikus események.

9. Hivatalos publikációs lista



**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/41/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sütő Máté István
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10056732

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Pázmándi, K. L.*, **Sütő, M. I.***, Fekete, T., Varga, A., Boldizsár, E., Boldogh, I., Bácsi, A.: Oxidized base 8-oxoguanine, a product of DNA repair processes, contributes to dendritic cell activation.
Free Radic. Biol. Med. 143, 209-220, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.08.010>
* These authors contributed equally this work.
IF: 6.17
2. Fekete, T., **Sütő, M. I.**, Bencze, D., Türk-Mázló, A., Szabó, A., Bíró, T., Bácsi, A., Pázmándi, K. L.: Human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells display distinct metabolic profile upon RIG-I activation.
Front. Immunol. 9, 1-32, 2018.
IF: 4.716

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,886

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,886

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

Debrecen, 2021.02.02.



10. Kulcsszavak

veleszületett immunitás, dendritikus sejt aktiváció, oxidatív stressz, 7, 8-dihidro-8-oxoguanin, 8-oxoguanin DNS glikoziláz 1, DNS bázis excíziós repair, metabolikus reprogramming, RIG-I, I-es típusú interferon, antivirális válasz

Köszönetnyilvánítás

„A hála egy olyan erény, amit meg kell becsülni.” - (Muha Bettina)

Ez az értekezés nem valósulhatott volna meg az engem körülvevő és támogató emberek nélkül, akik mindegyikének végtelen hálával tartozom.

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Bácsi Attila professzor úrnak, aki nem csak témavezetőként, de emberként is rengeteget segített. Köszönettel tartozom Dr. Rajnavölgyi Éva professzor asszonynak, hisz mindig volt egy-két jó észrevétele, bátorító szava a számomra. Szeretnék köszönetet mondani Dr. Bíró Tamás professzor úrnak, hogy egyenes úton terelt. Hálásan köszönöm Dr. Pázmándi Kitti Lindának, munkáját és segítségét, ami nélkül elveszttem volna a kutatás útvesztőjében. Köszönöm Dr. Gyöngyösi Adriennek, Dr. Varga Aliznak és Dr. Hajas Györgynek a PhD hallgató éveim alatt nyújtott támogatásukat és a tartalmas beszélgetéseket.

Köszönettel tartozom Orosz-Tóth Katalinnak, Kovácsné Nagy Erzsébetnek és Berki-Pál Angélának folyamatos segítségükért, jó tanácsaikért és gyakorlatias meglátásaikért, melyekből 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.

Köszönettel tartozom Dr. Csépany Tündének, Virág Jánosné Etelkának, Magosányi Erikának, valamint Muha Bettinának, akik egy percre sem kételkedtek benne, hogy képes leszek elémi a kitűzött célokat.

Köszönöm barátaim és rokonaim támogatását, akik, habár gyakran nem tudták, hogy milyen problémán is kattognak a fogaskerekeim, mégis mögöttem álltak rendületlenül.

Legnagyobb hálával mégis édesanyámnak, Júliának és nővéremnek, Andreának tartozok, akik sosem adták fel a belém vetett hitüket és tisztaszívvel, töretlenül támogattak az évek folyamán. Végül, de nem utolsó sorban a kísérleteink alkalmával használt állatoknak, mert áldozatuk remélhetőleg egy jobb jövőt szolgál.

Az értekezés az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 projekt támogatásával valósult meg.

A kutatást támogatta a Nemzeti Kutatás Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH K-125337) és a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 projekt. A TKP2020-IKA-04 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a 2020-4.1.1-TKP2020 pályázati program finanszírozásában valósult meg.