

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

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

Tartalomjegyzék

Rövidítések.....	5
I. Bevezetés.....	7
II. Irodalmi áttekintés	8
II.1 A dendritikus sejtek általános jellemzése	9
II.2 A dendritikus sejtek fejlődése.....	10
II.3 A dendritikus sejt altípusok fenotípusos és funkcionális jellemzése	10
II.3.1 Konvencionális dendritikus sejtek.....	10
II.3.2 Langerhans sejtek (LS).....	11
II.3.3 Monocita eredetű dendritikus sejtek	12
II.3.4 Plazmacitoid dendritikus sejtek	12
II.4 A dendritikus sejtek PAMP és DAMP receptorai.....	13
II.4.1 Endoszómális TLR-ek a dendritikus sejtekben.....	14
II.4.2 RIG-I receptorok a dendritikus sejtekben	15
II.4.3 DAMP-ok a szervezetben.....	15
II.5 A dendritikus sejtek aktivációját követő metabolikus változások.....	17
II.6.0 Az oxidatív stressz hatására létrejövő DNS károsodások és azok javítása.....	20
II.6.1 OGG1 BER-t követő változások	23
III. Célkitűzések	24
IV. Anyagok és módszerek.....	25
V. Eredmények.....	33
V.1 Az exogén 8-oxoG veszély szignál lehet a dendritikus sejtek számára	33
V.1.1 A 8-oxoG-nal történő intranazális kezelés a DS funkciókhoz köthető gének expressziójának megváltozását váltja ki egerekben.....	33
V.1.2 Az intranazális OVA-nal együtt adott 8-oxoG fokozza az OVA-specifikus IgE termelődését.....	35
V.1.3 Az exogén 8-oxoG megváltoztatja a humán moDS-ek fenotípusát, valamint citokin és kemokin termelésüket.....	36
V.1.4 A humán moDS-ek 8-oxoG általi aktiváláshoz szükséges az OGG1 kifejeződése	37
V.2 Az egyes humán dendritikus sejt altípusok eltérő anyagcsere változásokon mennek át a RIG-I-mediált aktivációjukat követően	40
V.2.1 A plazmacitoid DS-ek és a moDS-ek eltérő RIG-I expressziós profillal rendelkeznek	40
V.2.2 A glikolízis gátlása hatással van a GEN2.2 sejtek életképességére, valamint a RIG-I kifejeződésére.....	41

V.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.....	43
V.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	48
V.2.5	A glikolízis nélkülözhetetlen a RIG-I-indukált I-es típusú IFN termeléshez moDS-ekben	50
V.2.6	A glikolízis fokozódása szükséges a TLR9-stimulált primer humán pDS-ek és a RIG-I-aktivált moDS-ek által indukált allogen, naiv T sejtek proliferációjához	52
VI.	Megbeszélés.....	54
VII.	Új eredmények.....	62
VIII.	Összefoglalás.....	63
IX.	Referenciák.....	65
X.	Kulcsszavak	81
	Köszönetnyilvánítás	82
	Konferencia részvételek	83
I.	Kiegészítő táblázatok.....	84
II.	Kiegészítő táblázatok.....	88
	Függelék.....	99

Rövidítések

2-DG-	2-deoxi-D-glükóz	GEF-	guanozin-cserélő faktor
8-oxoG-	8-oxo-7,8-dihidroguanin	HK2-	hexokináz 2
ALR-	AIM2 szerű receptorok	HSC-	haematopoetikus őssejt
AMPK-	adenozin monofoszfát aktivált protein kináz	IFN-	interferon
APS-	antigén prezentáló sejtek	IL-	interleukin
ATP-	adenozin-trifoszfát	ILC-	veleszületett limfoid sejt
BER-	bázis excíziós repair	IRF3-	interferon reguláló faktor 3
BM-	csontvelő	LS-	Langerhans sejt
CARD-	kaspáz toborzó domén	LGP2-	Laboratory of genetics and physiology 2
CD-	cluster of differentiation	MAPK-	mitogén-aktivált protein kináz
cDS-	konvencionális dendritikus sejt	MAVS-	mitokondriális antivirális jelátvitel
CDP-	közös DS progenitor	MHC-	fő hisztokompatibilitási komplex
CLR-	C-típusú lektin receptor	MDA5-	melanóma differenciáció 5
DAMP-	veszély-asszociált molekuláris mintázat	moDS-	monocita eredetű dendritikus sejt
DFP-	dízel füst partikulum	NK sejt-	természetes ölósejt
DNS-	deoxiribonuklein sav	NLR-	NOD-szerű receptor
DS-	dendritikus sejt	OCR-	oxigénfogyasztási ráta
dsRNS-	duplaszálú RNS	OGG1-	8-oxoguanin DNS glikoziláz 1
ECAR-	extracelluláris savasodási ráta	OVA-	ovalbumin
EFA-	extracelluláris flux analízis	OXPHOS-	oxidatív foszforiláció
GDP, GTP-	guanozin-difoszfát, guanozin-trifoszfát	PAMP-	patogén-asszociált molekuláris mintázat

pDS-	plazmacitoid dendritikus sejt	RLR-	RIG-szerű receptor
PRR-	mintázat-felismerő receptor	RNS-	ribonukleinsav
Q-PCR-	quantitatív polimeráz láncreakció	ROS-	reaktív oxigéngyökök
RIG-I-	Retinsav indukálható gén 1	TBK1-	TANK kötő kináz 1
RIGL-	RIG ligandum	Tfh-	follikuláris segítő T sejt
		TLR-	Toll-szerű receptor

I. 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 kihasítja 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 veleszületett 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.

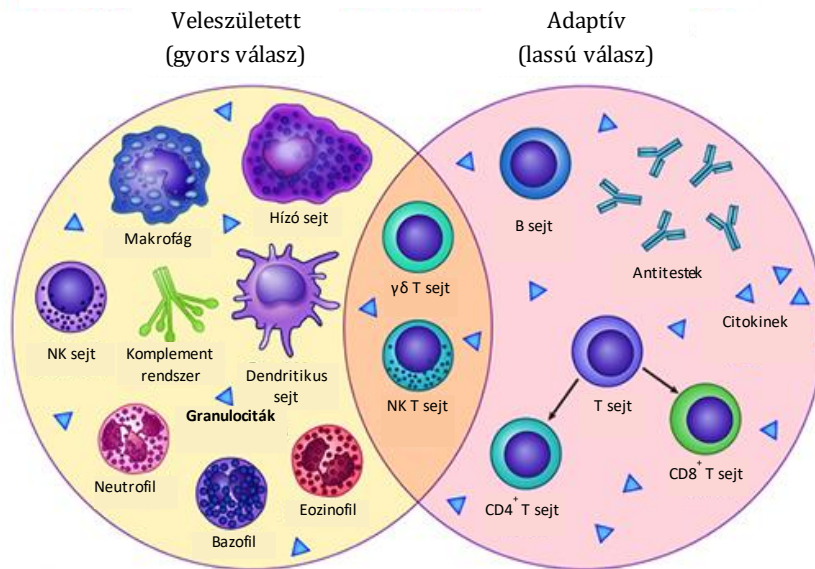
II. Irodalmi áttekintés

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 felismerést követően olyan azonnali védekező mechanizmusok indulnak be, melyeknek végső célja a kórokozók eliminálása [1,2]. 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 (**1. ábra**) [3].

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, habár memória-szerű jelenséget nemrégiben a veleszületett immunrendszer sejtjeinél is leírtak [4,5]. 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) [6] 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 [7].

A veleszületett és adaptív immunválaszok résztvevői



1. ábra: Az immunrendszer sejtjei. Az immunrendszert két részre, veleszületett és szerzett (adaptív) részre különítjük el. A veleszületett immunitás sejtjei gyors választ biztosítanak. Az általuk történő felismerés nem specifikus, aktivációjukat általában közös mintázatok váltják ki. Ezzel szemben a szerzett immunitás kialakulása napokat vesz igénybe, de eredményeként sokkal specifikusabb a felismerés, valamint immunológiai memória is kialakul. Az ábra G. Dranoff cikke alapján készült [8].

II.1 A dendritikus sejtek általános jellemzése

A DS-ek rendkívül fontos szerepet játszanak az exogén és endogén eredetű antigének bemutatásában, és ezáltal 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 [9] publikálta. Munkájuk során olyan nyúlányos 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 [10]. Ezek a myeloid eredetű klasszikus, vagy konvencionális dendritikus sejtek (cDS1 és cDS2 sejtek), a monocita eredetű dendritikus sejtek

(moDS-ek) [11], valamint a lymphoid eredetű pDS-ek [12]. Egyes szerzők - negyedik DS altípusként - a Langerhans sejteket (LS-ek) külön csoportként kezelik [13].

II.2 A dendritikus sejtek fejlődése

A DS-ek mind myeloid, mind lymphoid eredetűek lehetnek. Funkciójuk, érési folyamatuk függ az őket érő citokin, valamint aktiváló antigén környezettől [14,15]. Minden DS altípus fejlődéséért, specifikus transzkripciós faktor repertoár, az IRF8, IRF4, PU.1, ID2, E2-e, ZEB2, KLF4, IKZF1 és a BATF3 különböző szintű kifejeződése felelős [12]. A DS-ek fejlődése minden esetben, a csontvelőben (bone marrow, BM) kezdődik, ahol haematopoetikus őssejtek (HSC) közös myeloid progenitor sejtekké (common myeloid progenitor, CMP) differenciálódnak, melyek makrofág-dendritikus sejt prekurzorokká (MDP) fejlődhetnek. Habár az utóbbi években ezen sejtek létezése megkérdőjeleződött, úgy gondolják, hogy ezek a sejtek képesek lehetnek DS-ké vagy monocitává is differenciálódni [16]. Az utóbbi években a monociták kialakulását inkább a *committed monocyte progenitor*-okhoz (cMoP) kötik. A monociták belépnek a vérkeringésbe, majd perifériára jutva makrofággá vagy gyulladásos DS-ké alakulhatnak. Ezek a moDS-ek különböznek mind a cDS-ektől, mind a pDS-ektől. Az utóbb említett két sejtípus közös DS prekurzor sejtekből (CDP) alakulnak ki, melyek HSC-ből, illetve MDP-kből fejlődhetnek. Az azonban még nem pontosan tisztázott, hogy a nagy diverzitású, érett DS repertoár hogyan jön létre [17].

II.3 A dendritikus sejt altípusok fenotípusos és funkcionális jellemzése

II.3.1 Konvencionális dendritikus sejtek

II.3.1.1 A cDS1 sejtek

Mint az előbbieken már említésre került, két konvencionális DS típust különítünk el. Az egyik a cDS1 sejtek, amelyeknek mennyisége a cDS2 sejteknek körülbelül tizede a vérben és a szövetekben is. A cDS2 sejtekhez hasonlóan CD13-at, CD33-at, kevés CD11c-t és CD11b-t, valamint SIRPα-t fejeznek ki sejt felszínükön. Ezen kívül nagyszámú CD141 molekulát is kifejeznek, ami alapján különítették őket el először, ezért gyakran CD141⁺ cDS-ekként szokták őket emlegetni. A cDS1 fejlődést leginkább befolyásoló transzkripciós faktorok az IRF8 és a BATF3. Ezen kívül a GATA2, PU.1, GFI1, és ID2 transzkripciós faktorokat is fontos megemlíteni, mint a cDS fejlődést irányító faktorokat [15,18,19].

Funkciójukat tekintve a cDS1 sejtek potens keresztprezentáló sejtek. Ezt a funkciót összefüggésbe hozták az XCR1 kemokin receptor expressziójukkal. Fokozott készségük van CLEC9A-n keresztül a nekrotikus sejtpartikulumok felvételére és azok prezentálására. Ezek a sejtek elsődlegesen CD8⁺ T sejteknek prezentálnak effektíven, így fontos szerepük van a tumor ellenes és anti-virális immunitás kialakulásában [18].

II.3.1.2 A cDS2 sejtek

A vérben, lymphoid szervekben és egyéb szövetben található cDS-ek többsége cDS2 sejt. Felszíni markereik a CD1c, CD2, FcεR, SIRPα, valamint a CD11b, CD11c, CD13 és CD33 myeloid sejt felszíni antigének. Fejlődésükhöz több transzkripciós faktor is szükséges, mint az IRF4, KLF4 és a NOTCH2. Ezen kívül egyéb fontos transzkripciós faktoraik az ID2, GATA2, PU.1, GFI1, ZEB2 és a RelB [15,19]. Mégis legfontosabbnak és fejlődésük elsődleges irányítójának az IRF4-et tartják.

A myeloid cDS2 sejtek elsősorban extracelluláris antigének CD4⁺ segítő T sejteknek történő prezentálására specializálódtak, illetve kifejezett érzékenységet mutatnak a sérülések következtében felszabaduló, veszély-asszociált, szolubilis molekulák iránt [18].

II.3.2 Langerhans sejtek (LS)

A bőr nemcsak fizikai határként fontos a patogének elleni védekezésben, de a bőrszövetben többfajta immunsejt is megtalálható, amelyek egyik funkciója, hogy gyulladásos stimulust követően fenntartsák a bőr homeosztázisát. Az egyik ilyen bőrre specializálódott immunsejt az LS. Az utóbbi évek vizsgálatai során kiderült, hogy ezek a sejtek, olyan szöveti rezidens fagocita sejtek, amelyek a bőrben történő differenciációjuk során DS-szerű fenotípusos és funkcionális tulajdonságokra tesznek szert [20]. Az LS-ek, az epidermis bazális részében találhatóak, illetve egyéb laphámmal borított felszínek mentén. Konvencionális markereik, a langerin (CD207) a CD1a, az E-cadherin, EpCAM, és TROP2. Az LC-k fejlődése egyedi a DS-ek között, mivel a már kifejlődött LS-ek képesek csontvelőtől függetlenül az önmegújulásra a microglia sejtekhez hasonlóan, azonban velük ellentétben, gyulladásos stimulust (TNF-α, interleukin /IL-1β) követően az afferens nyirokerekken keresztül, a nyirokcsomókba migrálnak. Kiderült, hogy IL-15 hatására képesek keresztprezentációra, így a CD8⁺ T sejtek aktiválására is [20].

II.3.3 Monocita eredetű dendritikus sejtek

A monocita eredetű sejtek egy nagyon heterogén csoportot alkotnak. Közös jellemzőjük a CD13, CD33, CD11b, CD11c és CD172a expresszió. A klasszikus monociták mellett nem-klasszikus monocitákból (alacsony CD14 pozitivitás jellemzi ezeket a sejteket) is kialakulhatnak. A moDS-ek nyugalmi helyzetben megtalálhatóak a bőrben, a tüdőben és a belekben is. Gyulladásos folyamatok során a gyulladás helyszínére toborozódnak, ahol úgynevezett inflammatórikus DS-eket (iDS) képeznek [21]. A mikrokozonyezetnek megfelelően létrejöhetnek monocita eredetű DS-szerű sejtek (moDS), monocita eredetű makrofág-szerű sejtek (moM) vagy monocita eredetű LS-szerű sejtek (moLS). Gyulladás során nem migrálnak tovább a nyirokcsomókba, hanem a helyi DS-ek számát növelik és leginkább a T-sejt mediált válaszok effektor szakaszának fenntartásában vesznek részt [10,12].

II.3.4 Plazmacitoid dendritikus sejtek

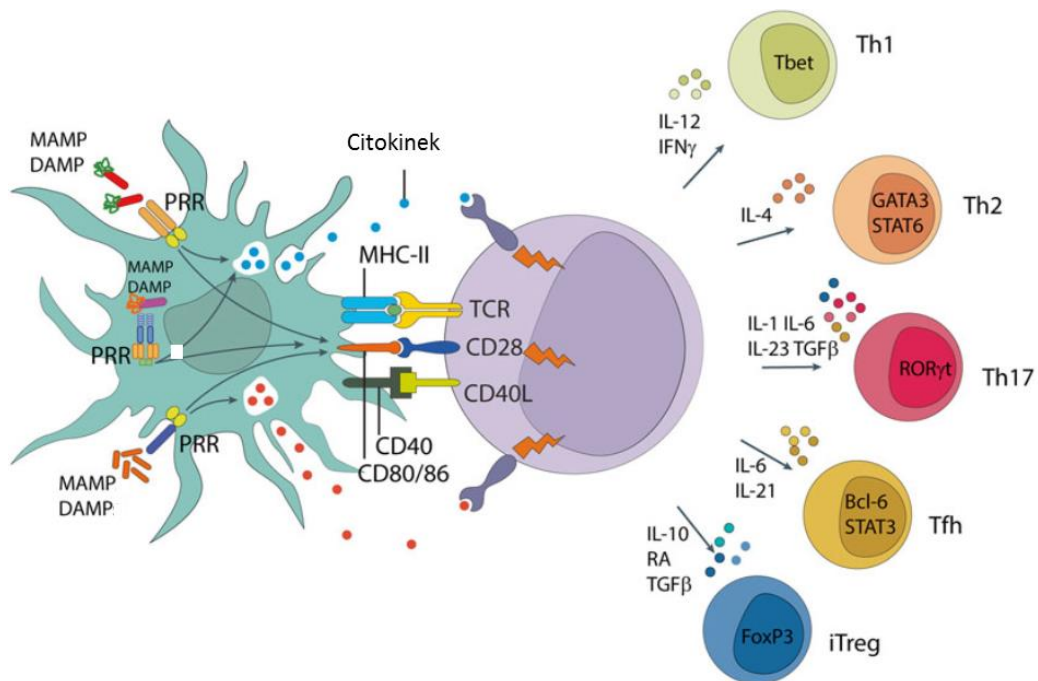
A pDS-eket először a vérben és mandulákban mutatták ki. Összességében nagyon kis számban találhatóak meg a szervezetben. Az összes leukocytának körülbelül 0,2 %-át teszik ki. A konvencionális sejtekkel ellentétben nem fejeznek ki felszínükön myeloid markereket, azonban kifejezik a CD123 és CD45RA molekulákat, melyek expressziója a myeloid fejlődés során általában lecsökken. Egyéb pDS markerek a CD303, a CD304, a CD85k és a CD85g. A pDS-ek fejlődésében egyik legfontosabb transzkripciós faktor az E2-2, mely az ID2-vel antagonizmusban kulcsfontosságú a lymphoid/myeloid fejlődés irányításában [15,19].

Habár a pDS-ek, az MHC-k mindkét típusát kifejezik sejt felszínükön, elsődleges funkciójuk mégsem az antigén prezentáció. Ezek a sejtek a szervezet legfontosabb I-es típusú IFN termelő sejtjei. Jellegzetes endoplazmatikus retikulummal és a plazmasejtekre jellemző Golgi apparátussal rendelkeznek, amely a nagy mennyiségű protein termeléssel magyarázható. Vírusfertőzést követően, endoszómális Toll-like receptoraikkal (TLR7, TLR9) képesek felismerni a víruseredetű mintázatokat, majd gyorsan, nagy mennyiségű I-es és III-as típusú IFN-t képesek termelni. Munkacsoportunk nemrégiben leírta, hogy a pDS-ek képesek citoszolikus RIG-I receptort is kifejezni TLR9 stimulust követően, és ennek szerepe van a pDS-ek kései IFN válaszában kialakulásában [22]. Az I-es típusú IFN-ok termelésével a pDS-ek képesek Th1 polarizációt indukálni, elősegítik a CD8⁺ T sejtek túlélését, szupresszálják a Th17 típusú válaszokat, illetve elősegítik a B sejtek izotípus váltását azáltal, hogy a myeloid DS-ekben fokozzák a BAFF és APRIL gének expresszióját [23,24].

II.4 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 legtöbb féle 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 [25]. 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 patomechanizmusaiban is [26–29]. 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) [30]. Ezek a receptorok különböző mértékben aktiválódnak a ligandumaikkal való találkozás alkalmával és a down-stream jelátvitelnek megfelelően különböző válaszokat alakíthatnak ki a DS-ekben [31] (2. ábra).



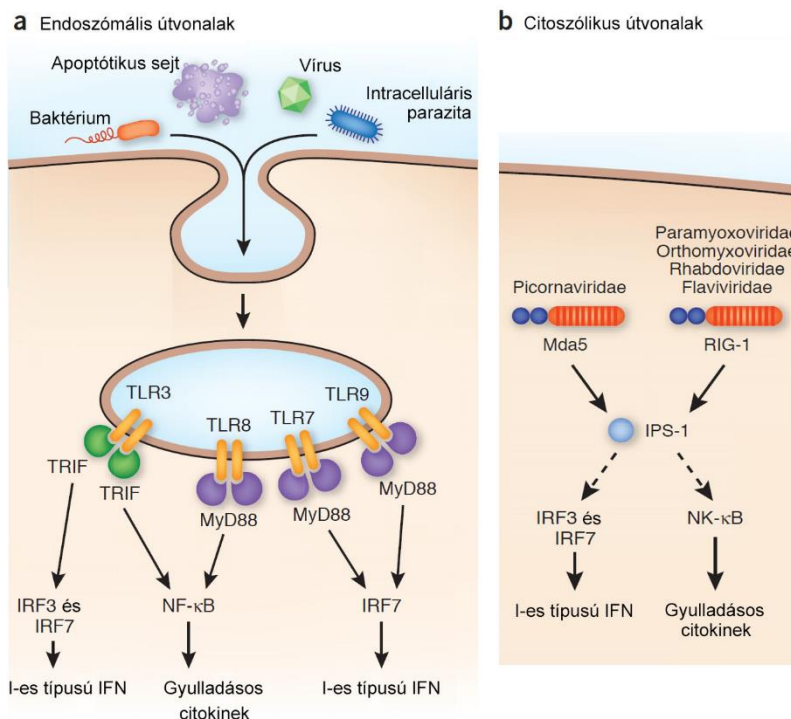
2. ábra: A dendritikus sejtek az immunrendszer karmesterei. A dendritikus sejtek a felszínükön és a citoszóljukban többféle mintázat-felismerő receptort (PRR) is expresszálnak. A mikroba (MAMP) vagy a sérülés (DAMP) felismerését követően aktiválódnak, majd a perifériás nyirokcsomókba vándorolnak. A nyirokcsomókban bemutatják a feldolgozott antigént az MHC molekuláikon keresztül, valamint ko-stimulációs jeleket is biztosítanak a naív T sejtek aktivációjához és effektor T sejté történő differenciálódásához. Az ábra Yang és munkatársai nyomán készült [25].

II.4.1 Endoszómális TLR-ek a dendritikus sejtekben

A vírusfertőzések során, az elsődleges szenzorok az endoszómális TLR-ek, illetve a citoszolban található RLR-ek (**3. ábra**) [32]. Négy endoszómális TLR-t különítünk el, a TLR3-at, a TLR7-et, a TLR8-at és a TLR9-et (**3. ábra**). 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 [33].

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 [34].

A TLR9 leginkább az endoszómába kerülő, metilátlan 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 [34].



3. ábra: Az idegen nukleinsavat felismerő intracelluláris PRR-ek. **a,** Az endoszómális TLR-ek homodimerek, amelyek idegen RNS-ek és DNS-ek felismerésére specializálódtak. **b,** A citoplazmában elhelyezkedő szolubilis RIG-I és Mda5 receptorok szintén képesek idegen nukleinsav molekulák érzékelésére. Mindkét receptor tartalmaz kaspáz-toborzó doméneket (CARD, kék körök) és egy helikáz domént (narancs pálcák), azonban különböző RNS struktúrákat ismernek fel. A RIG-I-et leginkább az 5' trifoszfó véggel rendelkező, rövid duplaszálú RNS struktúrák képesek aktiválni, míg az Mda5-ről úgy gondolják, hogy a hosszú, duplaszálú RNS-eket érzékeli [35].

II.4.2 RIG-I receptorok a dendritikus sejtekben

Akár csak a TLR-ek az RLR-ek is sejttípusonként 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 [22].

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 [36]. 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 transzkripció faktorokat és így az antivirális válaszokat [37].

II.4.3 DAMP-ok a szervezetben

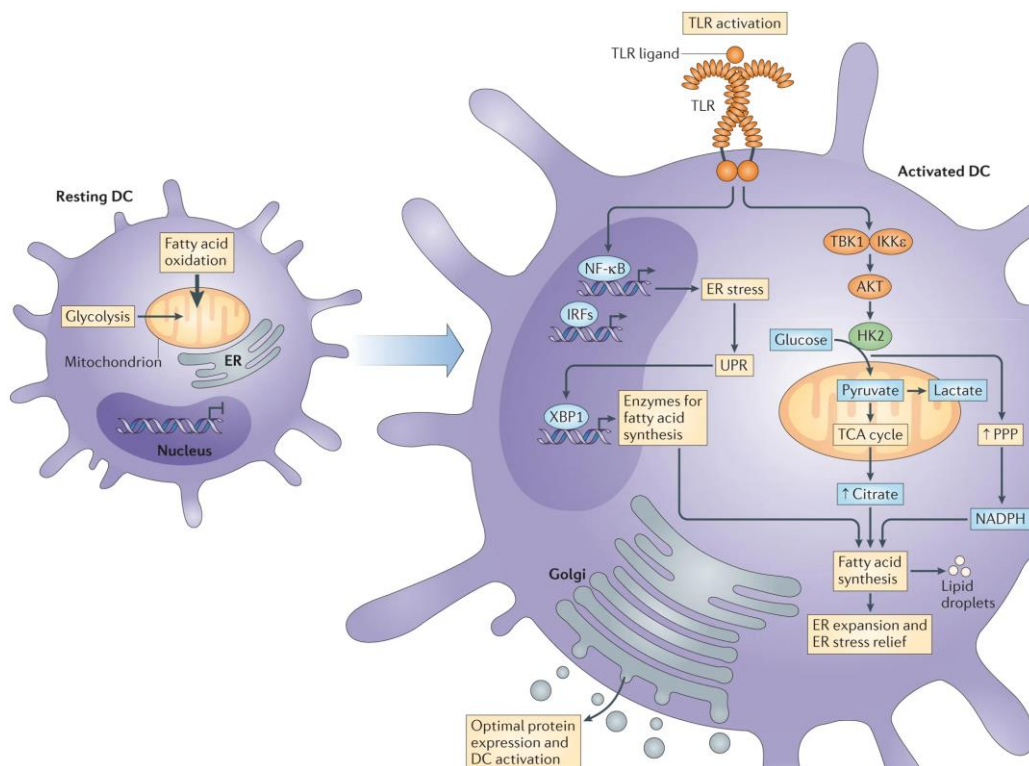
Habár a DAMP-ok, más néven alarminok, endogén eredetűek, képesek PAMP-okkal, illetve azok receptoraival is kölcsönhatásba lépni [38]. Eddig szinte minden, a szervezetben azonosított DAMP-ról kimutatták, hogy azok képesek kiváltani a DS-ek aktivációját és érését, legyen szó akár konvencionális, akár plazmacitoid DS-ekről (**1. táblázat**). A DS-ek aktivációját a sejtfelszíni kostimulátor molekulák (CD80, CD86) kifejeződésének fokozódása, az antigén prezentációs kapacitás (MHC-I és MHC-II molekulákon keresztül) növekedése, valamint a gyulladásos citokinek és kemokinek, mint például a TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL5, IL-10 és IL-12 termelésének fokozódása jellemzi. Az aktiválódott DS-ek képesek elindítani a T-sejt mediált immunválaszok kialakulását [39].

DAMP	Receptor		Biológiai hatás
HsP	TLR2/4		Megnövekedett effektor T sejt szám és aktivált T sejt túlélés. Fokozódik a DS-ek érése és az allogén T sejtek proliferációja
HMGB1	TLR2/4/9, CXCR4, RAGE		NF-κB vagy MAPK jelátvitel aktiváció, gyulladásos citokin termelés beindítása, sebgyógyulás fokozása.
α-Mannán	Dectin-1/2		NF-κB jelátvitel SYK-en keresztüli aktivációja, gyulladásos citokinek termelődése és effektor T sejt differenciáció.
ATP	P2X7R P2Y2	Purinerg receptor	GVHD esetén gazda APS-ek ko-stimulációs molekula (CD80, CD86) kifejeződése, donor CD4+ T-sejt proliferáció és IFN-γ termelés növekszik, Treg képződés csökken.
Húgysav	NLRP3		DS érés fokozódik, IL-1β termelés beindítása.
HMGN1	TLR4		DS aktiváció, éretlen neutrofilok, monociták, NK sejtek, hízósejtek toborzás
IL-1α	IL-1R		Makrofág, NK és CD8+ T sejtek tumorba való toborzása, ott memóriaképződés.
IL-33	ST2		Th2-polarizált immunválasz kialakítása, hízósejt toborzás, tumor ellenes immunitás kontextus függő gátlása vagy elősegítése, sebgyógyulás fokozása.
Defenzin (α,β)	CCR2, CCR6, TLR4/7/8/9		Direkt antimikrobiális hatás, DS aktiváció, NF-κB, IRF3 és IRF7 aktivációja, hízósejt degranuláció.
Kathelicidin	FPRL1, TLR7/8/9, P2X7, EGFR, MrgX2, CXCR2		Leukocitatorozás, hozzájárul az adaptív immunválasz fokozódásához, a hízósejtek migrációjához és degranulációjukhoz, K+ kiáramlásához, ezáltal NLRP3 oligomerizációjához és aktivációjához, direkt antimikrobiális hatás.
Granulizin	TLR4		Fagociták gyulladásos mediátor termelésének fokozása, direkt antimikrobiális hatás.
EDN	TLR2		Dendritikus sejtek érésének fokozása, fehérvérsejtek kemotaxisa, direkt antimikrobiális hatás.

1. táblázat. A DAMP-ok, receptoraik és azok biológiai hatása. HsP: Heatshock Protein, HMGB1: High Mobility Group Box 1, ATP: adenosine triphosphate, HMGN1: high mobility group nucleosome-binding domain 1 protein, EDN: eosinophil derived neurotoxin Chen; Toubai; Patel és munkatársaik munkái alapján készült táblázat [26,27,38].

II.5 A dendritikus sejtek aktivációját követő metabolikus változások

Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb hangsúly került az immunsejtek metabolizmusának vizsgálatára (4. ábra). 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 (4. ábra) [13,40].



4. ábra: A Toll-like receptoron történő felismerést követően a sejtaktivációt segítő, endoplazmatikus retikulum stressz és metabolikus változások is kialakulnak. PRR agonista expozíciót követően olyan jelátviteli útvonalak aktiválódnak, melyek hatására számos, a nukleáris faktor - κB (NF- κB) és az interferon- reguláló faktor (IRF) által szabályozott gén kifejeződése fokozódik. Ennek következtében endoplazmatikus retikulum (ER) stressz alakulhat ki és aktiválódik a sérült fehérjeválasz (unfolded protein response, UPR), mivel a sejt próbál alkalmazkodni a nagyobb mértékű szekréciós fehérje termeléshez. Az UPR egyik meghatározó effektor fehérjeje az X-box kötő fehérje 1 (X-box-binding protein 1, XBP1), mely aktiválja a zsírsav szintéziséért felelős gének transzkripcióját. A TLR-ek és valószínűleg más PRR-ek esetében is, ehhez társul a TANK-kötő kináz 1 (TBK1), az NF- κB kináz alegység-ε inhibitor (IKKε), az AKT és a hexokináz 2 (HK2) aktiválódása, amely fokozza a glikolízist, ezzel a zsírsav szintézishez szükséges citrát megnövekedett exportját eredményezi a mitokondriumokból. Ezzel párhuzamosan a pentóz-foszfát útvonal (penthose phosphate pathway, PPP) aktivitása is fokozódik, ami a zsírsav szintézishez elengedhetetlen kofaktor, a NADPH termelődését segíti. Az új zsírsavak szintézise lehetővé teszi az ER növekedését, amely csökkenti az ER stresszt és effektor molekulák szekréciójához vezet, aminek központi szerepe van a DS aktivációban [13].

A nyugvó állapotú DS-ek alapvetően katabolikus metabolizmust mutatnak, melynek energia szükségletét a Krebs ciklus (TCA) által hajtott oxidatív foszforáció (OXPHOS) fedezi. Ezeket a folyamatokat az adenosin monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK) szabályozza [13,41–43]. A felépítő folyamatokhoz szükséges glikolitikus intermedierek előállításához pedig az intracelluláris glikogént használják forrásként. Aktivációt követően a DS-ek anabolikus folyamatokkal, glikolízissel és tejsavas erjedéssel, biztosítják energia szükségleteiket, valamint nitrogén monoxid (NO) termelésbe kezdenek. Az NO képes gátolni az elektron transzportláncot, az ennek következtében felgyülemelő TCA intermediér molekulák támogatják a zsírsav szintézist, illetve a reaktív oxigéngyökök (ROS) és a további NO termelését [13,42,43].

A glikolízis fokozódása a DS aktiváció egyik jellegzetes folyamata, ami már röviddel a PAMP/DAMP aktivációt követően lejátsszódik [44–47]. A glükóz-piruvát útvonal gátlása hosszú távon képes befolyásolni a DS-ek érési folyamatait, a ko-stimulációs molekulák kifejeződését, a citokin termelésüket, illetve a T sejt aktiváló képességüket is. Ha a glikolízist blokkolják 2-deoxiglükózzal (2-DG), vagy valamilyen genetikai rendellenesség következtében kialakuló α -enoláz (ENO1) deficiencia, illetve laktát dehidrogenáz (LDHA) és piruvát dehidrogenáz kináz 1 (PDK1) fokozott kifejeződése esetén nem megfelelőképpen zajlik le az *in vitro* differenciáltatott DS-ek aktivációja [47–49]. Az ilyen DS-ek LPS-sel vagy chlamydiával történő stimulációt követően, a T sejteket Th1 és Th2 irányú polarizáció helyett Th17, vagy regulatórikus T sejt irányba polarizálják [48]. Az influenza A vírussal aktivált humán pDS-eknél, a 2-DG kezelés hatására szintén csökken a ko-stimulációs molekulák kifejeződése, illetve az I-es típusú interferon (IFN-I) expressziója is [46].

Jelenlegi ismereteink szerint, a glikolízis gátlása nincs hatással a humán moDS-ek fagocitáló képességére, azonban a glükóz és a fokozott glikolitikus aktivitás szükséges a DS-ek migrációjához [48]. A glükóz hiányos közegben tartott DS-ekben lecsökken a sejtek mobilitása, morfológiájuk inkább lekerekedett, valamint csökken a nyirokcsomókba való migrációjuk is [50]. Ez utóbbi megfigyelhető a hipoxia indukált faktor-1 α (HIF1 α) deficiens DS-eknél is. Hipoxiás környezetben differenciálódott DS-eknek fokozódik a migrációs képessége, és azt feltételezik, hogy ez egy HIF1 α függő folyamat [51].

A glikolitikus váltásnak a DS-ekben több szabályozási pontja is van. A DS-ek glükóz felvétele, amely kapcsolatban áll a sejtek glikolitikus aktivitásával, DS altípustól függően különböző lehet [44]. A DS-ekben a glikolitikus váltás az aktivációt követően percekben belül megkezdődik. Az indukálható glükóz transzporter 1 (GLUT1) kifejeződése azonban csak órákkal a TLR-stimulációt követően emelkedik meg. Ez arra utal, hogy DS-ek közvetlenül a

TLR-mediált aktiváció után intracelluláris glikogénből fedezik a glükóz igényüket. Az aktiválást követő későbbi időintervallumban, azonban megnő a sejtek extracelluláris glükózfelvétele. Ezt a megnövekedett GLUT1 expressziója is igazolja, melynek gátlása következtében csökken a CD40 és CD86 molekulák kifejeződése [53]. 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 [52].

A glikolitikus váltást rövid távon leginkább a TANK-kötő kináz-1 (TBK1)/I κ B kináz- ϵ (IKK ϵ)/AKT/hexokináz 2 (HK2) útvonal (**4. ábra**) aktivációja vezérli, hosszú távon pedig az mTOR és /vagy a HIF1 α indukciója. A TBK1 és az IKK ϵ már percekkel a DS-t érő LPS stimulust követően aktiválódnak, ami az AKT foszforilációját és a HK2 mitokondriumhoz kötődését eredményezi. Ezek a folyamatok támogatják a glikolízis beindulását, valamint a glikolízis fenntartását a sejt aktivációját követő korai szakaszban [54]. 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 [44,50]. Gyenge stimulus esetében, az aktiváció után 18 órával, az AKT, mTORC1 és mTORC2 szintje fokozatosan csökken, akár csak a sejt glikolitikus aktivitása. Az AMPK aktivációjának fokozódása fordítottan hat a DS-ek éréseire, így az aktív AMPK a csökkent proinflammatórikus DS funkciókkal áll összefüggésben [50]. 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 [55].

A HIF1 α stabilizációja szintén fokozódó glikolitikus aktivációt eredményező folyamat, mivel a glikolitikus gének nagytöbbsége HIF1 α célgén is [45,47,52,56]. 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 [51]. A HIF1 α hiánya, vagy működésének gátlása esetén ezek a jelenségek nem figyelhetők meg [47].

A mikrokörnyezetből származó jelek is befolyásolhatják a DS-ek funkcióit. Ezek a hatások gyakran a glükóz metabolizmus módosításával járnak együtt. Az egyik már leírt mechanizmus az IL-10 általi DS aktiváció gátlás, mely valószínűleg az AMPK aktív formában

tartása miatt jön létre [44,49]. Különböző exogén metabolitok, mint egyes zsírsavak vagy akár a laktát is képes a DS-ek funkcióját befolyásolni. Ez utóbbi a HIF1 α stabilizációjával képes a glikolízist fenntartani. A butirát rövid szénláncú zsírsav, amely a glikolízis gátlásával képes befolyásolni a DS érését. Humán moDS-eknél figyelték meg, hogy a butirát az LPS stimulációt követően a moDS-ek T sejt polarizációs képességét Treg irányba modulálja [57].

II.6.0 Az oxidatív stressz hatására létrejövő DNS károsodások és azok javítása

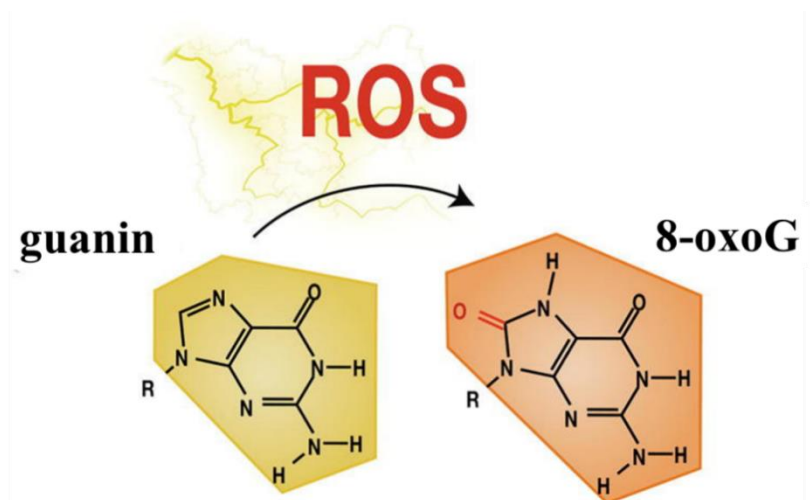
Oxidatív stressz akkor lép fel egy szervezetben, amikor az oxidatív hatások és az antioxidáns kapacitás közti egyensúly felborul. Az oxidatív ágensek endogén, illetve exogén eredetűek is lehetnek. Jelentős mennyiségű reaktív oxigénszármazékok termelődnek a mitokondriális légzési lánc működése során. A légzési lánc I. és III. komplexe a felelős leginkább a mitokondriális ROS termelésért [58]. 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 [59]. Az exogén eredetű ROS forrásai lehetnek a különböző sugárzások, légszennyező részecskék vagy akár a növényi pollenek NADPH oxidázai is [60,61]. Szuperoxid anionok ($O_2^{\cdot-}$) kialakulhatnak különböző molekulák, mint például dopamin, adrenalin, flavonoidok vagy hidroquinolinok autooxidációja következtében is [62].

A leggyakrabban létrejövő ROS molekulák a szuperoxid anionok, a hidroxil gyökök ($OH^{\cdot}$), a peroxil gyökök ($-ROO^{\cdot}$), az alkoxil gyökök ($-RO^{\cdot}$), valamint a hidrogén peroxid (H_2O_2), a hipoklórsav ($HOCl$) és a peroxinitril ($ONOO^{\cdot}$).

Habár a reaktív gyököknek fontos szerepük van a sejtek homeosztázisának fenntartásában, a mikrobák elleni védekezésben és egyes szignalizációs útvonalakban [63], 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. Létrejöhet teljes, vagy részleges lánctörés, a purin és pirimidin bázisok, vagy a cukor rész módosulásai, vagy fehérjékkel történő keresztkötődés is. Ezek a módosulások fontos szerepet játszhatnak nemcsak az öregedési és neurodegeneratív folyamatokban, a karcinogenezisben, a kardiovaszkuláris és autoimmun betegségekben, de akár az allergiás kórképek kialakulásában is [64].

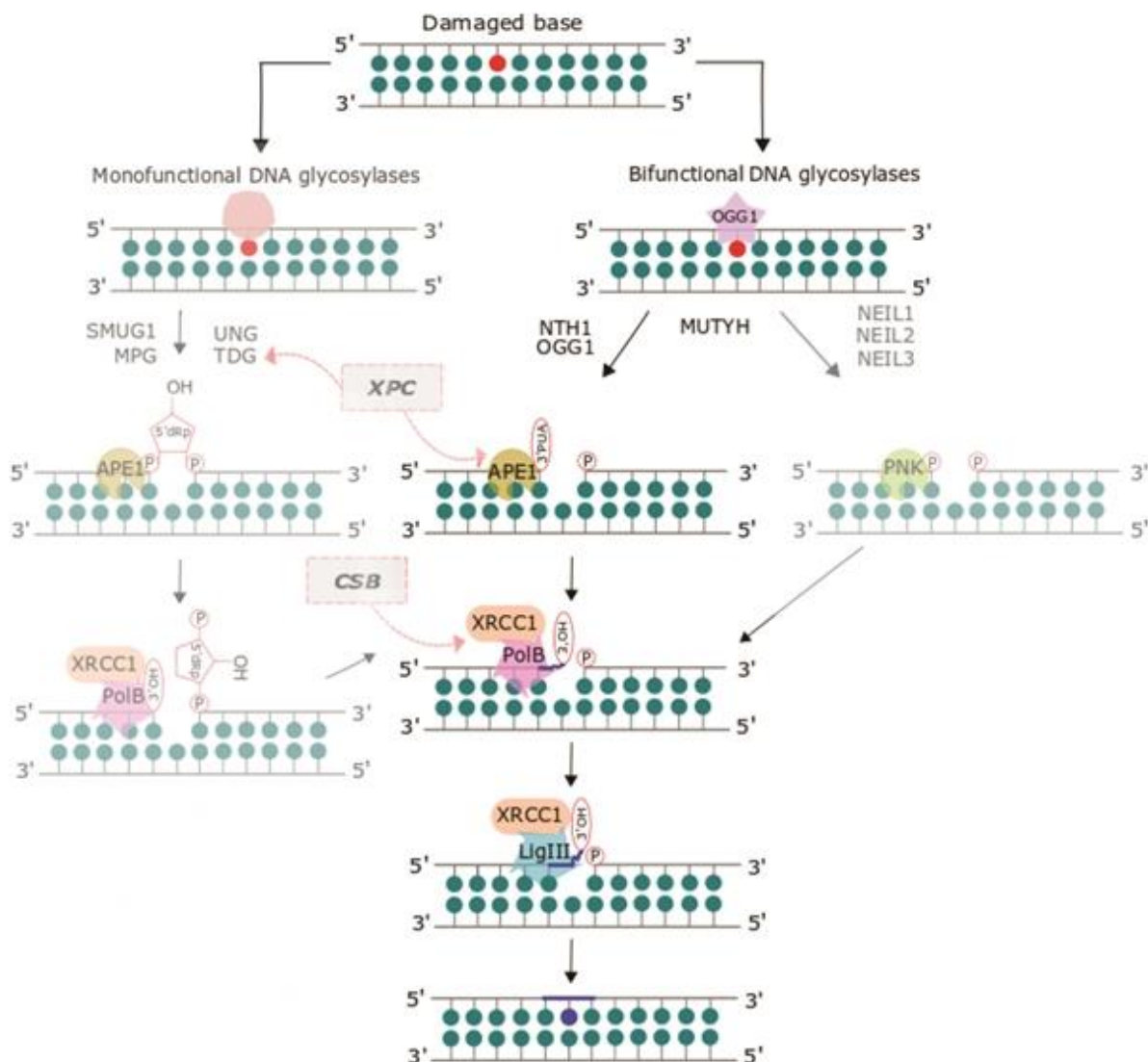
A DNS-ben található bázisok közül, a guanin bázisok a legfogékonyabbak az oxidatív károsodásra, hiszen ezek a bázisok rendelkeznek a legkisebb oxidációs potenciállal. Naponta körülbelül 100 000 guanin oxidáció jön létre egy eukarióta sejtben [65]. A guanin különböző

oxidált formái közül, a 8-oxoG (**5. ábra**) a leggyakrabban előforduló módosulat [66,67]. Ha ez a károsodott bázis nem kerül kijavításra a replikáció folyamán, a 8-oxoG egy adenin bázissal párosíthat, így transzverziós mutáció jöhet létre az újonnan szintetizálódó DNS szálban.



5. ábra: *Reaktív oxigéngyökök hatására leggyakrabban kialakuló oxidált módosulata a guanin bázisnak a 8-oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoG) [65].*

Az emlősökben a 8-oxoG kijavításáért felelős egyik enzim az OGG1, mely képes az intrahelikális 8-oxoG-t elektrokémiai tulajdonságai alapján felismerni, majd BER mechanizmus során kivágni a DNS-ből [68]. 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 (**6. ábra**). Ennek során a DNS glikozilázok hidrolizálják a N-glikozil kötéseket, így kivágnak a módosult bázist az eredeti pozíciójából. Ezt vagy az AP liáz, vagy az AP endonukleáz (APE) érzékeli, majd hasítja a DNS cukorfoszfát gerincét. A kialakult bázis hiányt a DNS polimeráz kitölti és végül a DNS ligáz állítja helyre a duplaszálú DNS integritását. Habár az emlősökben már közel egy tucat glikoziláz enzimet leírtak, három olyan főbb enzim található köztük, melyik képes oxidációt követően a BER folyamatot beindítani. Az uracil DNS glikoziláz (UNG), mely az uracil molekulát képes eltávolítani a DNS-ből. Az OGG1 habár képes egyéb oxidált purint is felismerni, elsődlegesen a 8-oxoG-t távolítja el, valamint bifunkcionális enzimeként AP liáz aktivitással is rendelkezik, akár csak az endonukleáz III homológ 1 (NTH1), ami az oxidálódott pirimidin bázisokat hasítja ki [69].



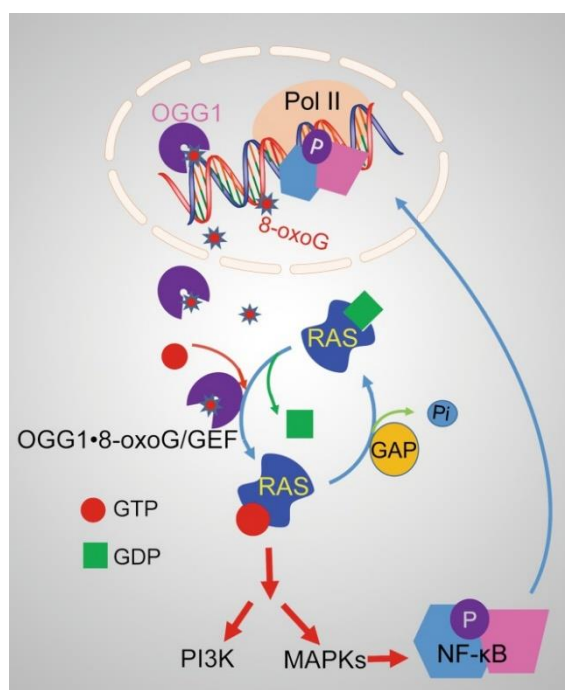
6. ábra: Oxidatív károsodást követő bázis excíziós repair mechanizmus. A folyamat elején a glikozilázok kifordítják és kivágják a károsodott bázist, majd az APE1 kialakítja a DNS polimeráz (PolB) számára megfelelő 3'-OH végeket a DNS cukorfoszfat gerincében. A DNS polimeráz feltölti az üredest, végül a DNS ligáz (LigIII) visszaállítja a duplaszálú DNS integritását. Az ábra Kumar és mtsai közleménye alapján készült [70].

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 [71]. 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 fiziológias tartomány felett van, az életidejük nem csökken szignifikáns mértékben [72]. Meglepő módon, a vad-típusú társaikhoz viszonyítva a különböző gyulladásokkal - például az LPS kezeléssel kiváltott gyulladással -

szemben is ellenállóbbnak bizonyulnak [73]. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az OGG1-nek vagy a felszabaduló 8-oxoG-nak lehet olyan hatása, amely felelős a gyulladásos válaszok beindításáért.

II.6.1 OGG1 BER-t követő változások

Régebben úgy gondolták, hogy a 8-oxoG kis molekula lévén, passzív módon távozik a sejtből, majd a későbbiekben a vizelettel kiválasztódik a szervezetből. Ezért is használják a vizeletben mérhető koncentrációjának meghatározását az oxidatív stressz mértékének becslésére [66]. 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 [74]. A kialakuló OGG1-8-oxoG komplex guanin-nukleotid cserélő faktorként képes a kis molekula súlyú GTPázokat aktiválni (**7. ábra**), mint például a K-Ras [74,75], Rac1 [76] és RhoA [77], és így fokozni a down-stream gének kifejeződését [75,78,79]. Oxidatív környezetben az OGG1 képes az NF- κ B promóter régiójához kötődni, és ezzel fokozza a pro- inflammatorikus gének kifejeződését [74,80]. 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, mint például a makrofágok aktivációjához szükséges citokin, integrin és interleukin jelátviteli útvonalakban résztvevő gének kifejeződése [81].



7. ábra: Az OGG1 fehérjének a DNS javítástól eltérő funkciója. Az OGG1 az általa kihasított szabad 8-oxoG bázissal komplexben guanin-nukleotid cserélő faktorként (guanine- nucleotide exchange factor, GEF) hat a kis molekulásúlyú GTPázokra, így képes különböző jelátviteli utakat aktiválni. Az ábra Wang és mtsai közleményéből származik [82].

III. 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 próbáltunk válaszolni:

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

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

I/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?

II/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?

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

II/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?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1 Állatok kezelése transzkriptom analízishez

Az állatkísérletek az amerikai „*National Institute of Health*” (NIH), „*Guide for Care and Use of Experimental Animals*” (Állatok gondozása és kísérletekben történő felhasználásuk) szabványainak megfelelően történtek, valamint a „*University of Texas Medical Branch*” (UTMB), „*Animal Care and Use Committee*” engedélyével történtek (engedély szám: 0807044A). A kísérletekhez nyolc hetes BALB/c egereket (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) 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 µl pH-semlegesített 8-oxoG (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) oldattal (pH: 4,5; 0,0005 mg/kg), vagy fiziológiás só oldattal. 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.

IV.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 µg/egér ovalbuminnal (OVA, Grade V, A5503, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) önmagában 60 µl térfogatban, vagy 0,1, 1 vagy 10 µM-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 szérumszinteket ELISA kit-ek (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) felhasználásával mértük a gyártó útmutatóinak megfelelően. Az abszorbanciát Synergy HT micropalate reader-rel (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) detektáltuk 450 nm-en.

IV.3 Primer humán sejtek szeparálása

Az egészséges donorokból származó „*buffy coat*” készítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat, Debreceni Regionális Vérellátó Központjából kaptuk, és azokat az Országos Vérellátó Szolgálat vezetőjének és a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével használtuk. A perifériális vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)

grádiens centrifugálással nyertük ki a „*buffy coat*”-ból. A PBMC-kből a monocitákat pozitív szelekció során, anti-CD14 konjugált mikrogönggyökkel (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) 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 sejtenyésztő lemezekre tettük 1×10^6 sejt/ml számban. A tenyésztést RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) médiumban végeztük. Ezt 100 U/ml penicilinnel, 100 μ g/ml streptomycinnel (Biosera Ltd, Ringmer, UK), 10% hőinaktivált magzati marha szérummal (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 80 ng/ml granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktorról (GM-CSF; Peprotech EC, London) és 100 ng/ml IL-4-gyel (Peprotech EC, London, UK) 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* (Miltenyi Biotec) felhasználásával, majd 1×10^5 sejt/ 200 μ l RPMI 1640 médiumban, 96 lyukú sejtenyésztő lemezre tettük. A médiumot 10% hőinaktivált FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal 100 U/ml penicilinnel, 100 μ g/ml streptomycinnel (Biosera Ltd.) és 50 ng/ml rekombináns humán IL-3-mal (PeproTech) egészítettük ki. A ko-kultúra kísérletekhez PBMC-ből allogén naív CD8⁺ T sejteket izoláltunk, *Human naïve CD8⁺ T cell isolation kit*-tel (Miltenyi Biotec), a gyártó utasításainak megfelelően. A primer humán pDS izolálást Bencze Dóra hajtotta végre.

IV.4 A GEN2.2 sejtvonal

Kísérleteinkhez a Dr. Joel Plumas és Dr. Laurence Chaperot által rendelkezésre bocsátott humán plazmacitoid dendritikus sejtvonalat, a GEN2.2-t (Research and Development Laboratory, French Blood Bank Rhône-Alpes, Grenoble, France) 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 μ g/ml streptomycinnel (mindkettő Sigma-Aldrich) és 5% nem esszenciális aminosavakkal (Life Technologies Corporation) kiegészített RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich). A kísérletekhez, a GEN2.2 sejteket eltávolítottuk a *feeder* sejtrétegről, majd 24 lyukú tenyésztőlemezre helyeztük azokat 5×10^5 sejt/ 500 μ l sűrűségben,

RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich). A sejtvonal tenyésztését és az inkubációkat 37°C-os termosztátban végeztük, 5% CO₂ szaturáció mellett.

IV.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, ODN2006; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) kezeltünk. Inkubációs időszakokban a sejteket 37°C-on, párásított, 5% CO₂ inkubátorban tartottuk. A TLR aktivációhoz a GEN2.2 sejteket és a primer pDS-eket 12 órán keresztül CpG-A (ODN 2216, 1 µM; Hycult Biotech, Uden, The Netherlands) 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 (InvivoGen, San Diego, CA, USA), specifikus RIG-I agonistával stimuláltuk, LyoVec™ (InvivoGen) transzfekciós reagens felhasználásával, a gyártó felhasználási útmutatásai szerint.

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

IV.6 RNS izolálás egér tüdőből

Nazális kezelést követően, eltávolítottuk az egerek tüdejét, majd lízis pufferben (Qiagen, Valencia, CA, USA), *TissueMiser*® (Fisher, Pittsburgh, PA, USA) készülékkel homogenizáltuk azokat. Az RNS izolálása *RNeasy kit* (Qiagen) használatával történt, a gyártó által megadott leírásnak megfelelően. Az RNS koncentrációkat *Epoch Take-3™ system* (BioTek, Winooski, VT, USA) 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.

IV.7 Új generációs szekvenálás

Génkönyvtár készítéséhez, a szekvenálást (deep sequencing) az *UTMB Next-Generation Sequencing (NGS) Core Facility* intézetében, *Illumina HiSeq 1000 sequencing system* (Illumina

Inc., San Diego, CA, USA) készüléssel végeztük, Aguilera-Aguirre, 2015 módszere szerint [81]. 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 (Illumina, Part#15016648). 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 készüléssel vizsgáltuk. A könyvtár DNS templátok mennyiségi analizisét Q-PCR-rel és ismert méretű referencia standardokkal végeztük.

A DNS templátok klaszterekbe rendezéséhez, *TruSeq PE Cluster Kit version 3* (Illumina) 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 version3* (Illumina) kit-tel, Illumina HiSeq 1000 készüléken végeztük a gyártó útmutatása alapján. A nyers szekvencia adatokat CASAVA-1.8.2-vel konvertáltuk FASTQ fájlkká. 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 [83]. Annak érdekében, hogy megerősítsük a kiválasztott gének transzkripció szintjeit, egy *SAB biosciences RT profiler PCR Array assay*-t (PAMM-090A, Qiagen) használtunk, a gyártó utasításainak megfelelően. A vizsgálatot SYBR® Green qRT-PCR-rel, egy ABI7000 Sequence Detector (Life Technologies, Grand Island, NY) készüléken végeztünk. A génexpresszióban történt változások meghatározására a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztunk. A kalibrációhoz stimulálatlan sejteket használtunk, majd eredményeinket GAPDH-ra a normalizáltuk [83].

Az újgenerációs szekvenálást Boldogh István és mtsai végezték mely eredmények felhasználását a rendelkezésünkre bocsájtottak.

IV.8 Gén ontológiai vizsgálatok

A teljes transzkriptomból készült hőtérképeket és a hierarchikus klasztereket Morpheus online szoftverrel készítettük (Broad Institute, [http:// broadinstitute.org/morpheus](http://broadinstitute.org/morpheus)). A Venn

diagramok készítéséhez a Venny 2.1 szoftvert használtuk (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny//index.html>). Az egér DS aktivációval bizonyítottan összeköthető gének listájának készítéséhez a Mouse Genome Informatics gén ontológiai böngészőjét (MGI, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, (http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology/), és a *Mouse Dendritic and Antigen Presenting Cell RT² Profiler PCR Array* (Qiagen) génlistáját használtuk.

IV.9 Géncsendesítési kísérletek

A frissen izolált monocitákat 3 μ M OGG1 -specifikus siGENOME Smartpool, vagy nem target, kis interferáló RNS-sel (siRNS, Dharmacon, Pittsburgh, PA, USA) elektroporáltuk Opti-MEM médiumban (Life Technologies), 4 mm-es küvettákat (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) alkalmazva *GenePulser Xcell* készülékkel (Bio-Rad). 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.

IV.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 (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany). 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; Abcam, Cambridge, UK) vagy anti RIG-I (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) és anti- β -aktin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) primer antitestekkel. A primer antitestek detektálásához, a membránt torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (anti-nyúl; Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany vagy anti-egér, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) inkubáltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten. A fehérje minták kimutatásához kemilumineszcens rendszert (Supersignal West Pico/Femto chemiluminescent substrate; Thermo Scientific, Rockford IL, USA) használtunk. A western blot filmeket beszkenneltük, majd denzitometráltuk Kodak 1D Image Analysis 3.6-os verziójú szoftver (Kodak Digital Science Imaging, Eastman Kodak, New Haven, CT, USA) segítségével. A relatív denzitások meghatározásához az OGG1, RIG-I sávok intenzitását és a hozzájuk tartozó β -aktin sávok intenzitásának arányát használtuk.

IV.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. Az összes monoklonális és izotípus kontroll antitestet a BioLegend-től (San Diego, CA, USA) szereztük be. A fluoreszcencia intenzitások méréséhez, FACS Calibur áramlási citométert (BD Biosciences Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ, USA) 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. Az adatok kiértékelését FlowJo szoftverrel (TreeStar, Ashland, OR, USA) végeztük.

IV.12 Sejtek életképességének meghatározása

A sejtek életképességét 7- aminoaktinomycin D (7-AAD; 10µg/ml; Sigma- Aldrich) festéssel határoztuk meg. Ehhez a sejteket 15 percig jelöltük, majd áramlási citometriával FACS Calibur citométeren (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) mértük a fluoreszcencia intenzitásokat. Az adatokat FlowJo szoftverrel (TreeStar, Ashlan, OR, USA) értékeltük ki.

IV.13 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 kiteket (BD OptEIA; BD Biosciences, San Diego, CA, USA) használtunk. IFN- α és IFN- β szintek mérését, *VeriKine™ Human Interferon Alpha and Beta ELISA kit*-tel (PBL Interferon Sources Piscataway, NJ, USA) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A sejtek tejsav termelésének detektálásához *Glycolysis Cell-Based Assay Kit*-et (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) használtunk. Abszorbancia értékek mérését, *Synergy HT microplate reader* (Bio- Tek Instruments, Winooski, VT, USA) készüléken végeztük, a citokinek és kemokin kimutatását 450 nm-en, a laktát assay-t pedig 490 nm-en végeztük.

IV.14 Extracelluláris Flux Analízis

A valós idejű extracelluláris flux analízishez (EFA) a humán pDS-eket és moDS-eket összegyűjtöttük, mostuk, majd felvettük *Agilent Seahorse XF Base* médiumban (pH 7,4, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), amit 10 mM glükózzal, 2 mM glutaminnal és 1% FBS-sel egészítettünk ki. A sejteket Cell-Tak fedett (Corning Inc., NY, USA) *Seahorse XF96 Cell Culture Microplate*-ekre (Agilent Technologies) helyeztük 1.5×10^5 sejt/ lyuk sűrűségben. A kísérleteket megelőzően, a sejteket 1 órán keresztül, 37°C-on CO₂ nélküli inkubátorban tartottuk. Az extracelluláris savasodási ráta (extracellular acidification rate, ECAR) mérését párhuzamosan, valós időben végeztük *Seahorse XF96e Extracellular Flux analyzer* (EFA; Agilent Technologies) készülékkel. A CpG-A-t és az 5'ppp-dsRNS-t közvetlenül az EFA méréseket megelőzően adtuk a rendszerekhez. Az extracelluláris flux analízist Pázmándi Kitti Linda végezte, az eredményeket az engedélyével használtam.

IV.15 Kvantitatív, valós idejű PCR

A teljes RNS izolátumokat 5×10^5 sejtől vontunk ki Tri reagenssel (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). Annak érdekében, hogy elkerüljük a genomi DNS amplifikációját, az RNS izolátumot DNáz I-gyel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kezeltük, majd reverz transzkripcióval cDNS-t állítottunk elő. Ehhez *High Capacity cDNA RT Kit*-et használtunk (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). 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 (Coraville, IA, USA) szereztük be. A kvantitatív PCR-hoz *ABI StepOne Real-Time PCR System*-et (Applied Biosystems) használtunk. A ciklus küszöbértéket (cT) a StepOne v2.1 Szoftver (Applied Biosystem) segítségével határoztuk meg. Az mRNS relatív értékét ($2^{-\Delta CT}$) minden esetben a PPIA (Integrated DNA Technologies) háztartási génre normalizáltuk. A q-RT PCR eredményeket Fekete Tünde bocsájtotta rendelkezésemre.

IV.16 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, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) jelöltük, 1 μ g/ml anti-humán CD3 monoklonális antitest (BD Pharmingen) jelenlétében. A ko-kultúrában tenyésztést követően a CFSE festék fluoreszcencia intenzitását a BD FACS Calibur áramlási citométer (Becton Dickinson) FL1 (530 $\pm$ 15 nm) csatornáján detektáltuk. Az adatokat FlowJo szoftverrel (Treestar) értékeltük.

IV.17 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 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, USA) használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0.05$ értéket tekintettük.

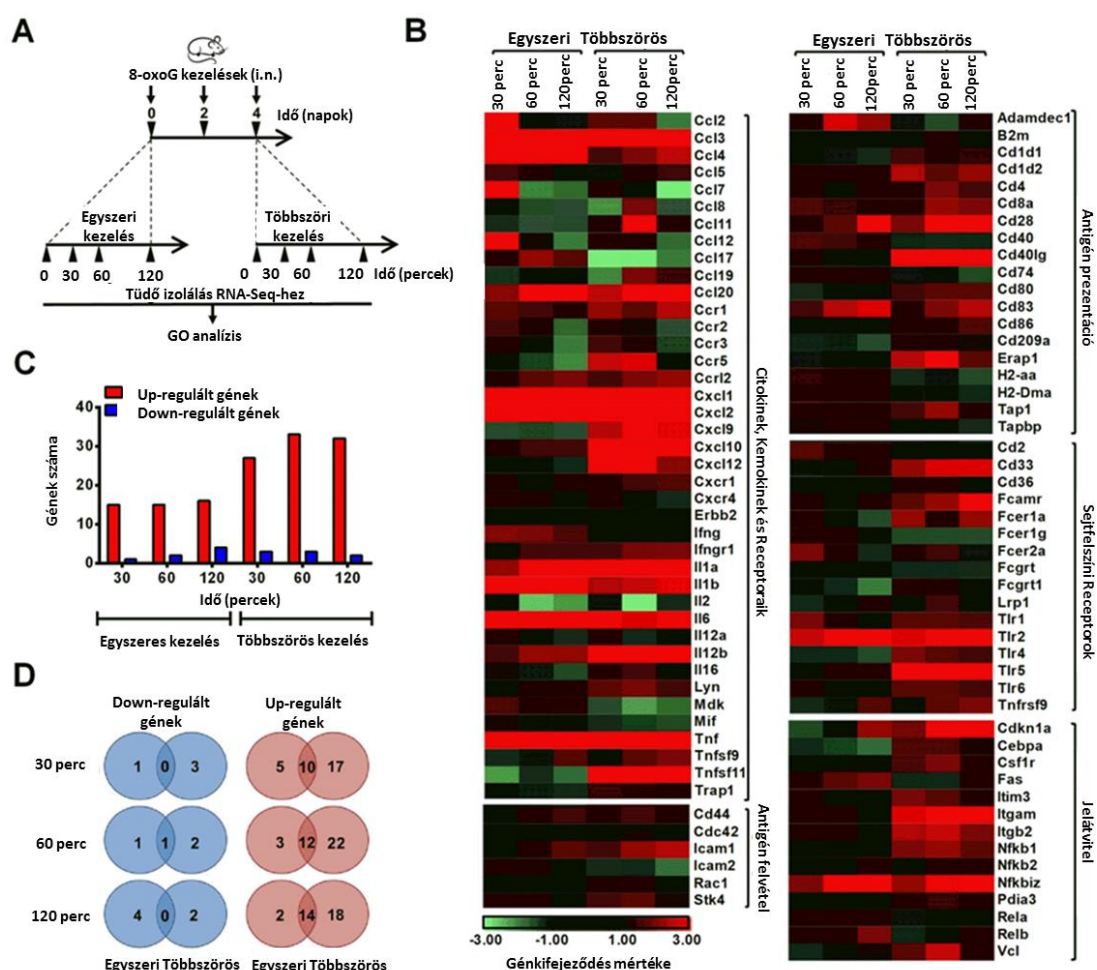
V. Eredmények

V.1 Az exogén 8-oxoG veszély szignál lehet a dendritikus sejtek számára

V.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 [81,84]. Annak érdekében, hogy az OGG1-mediált 8-oxoG képződést modellezzék a légutakban, egereket 8-oxoG-nal - az OGG1-BER specifikus termékével [85] - kezeltek intranazálisan. Az egerek egyszeri kezelést kaptak, vagy többszöri 8-oxoG kezeléseken estek át a 0., 2. és 4. napon [81,84]. 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 kezelést követően (**8. A ábra**). 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) [81,84]. 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 (**I. Kiegészítő táblázatok**). Az egyszeri és ismételt 8-oxoG kezelésekből nyert RNS szekvenálási adatokat összevetettük a listánkba kiválasztott génekkel. A génklasztereket (citokinek, kemokinek és receptoraik; antigén felvétel; antigén prezentáció; sejt felszíni receptorok; szignál transzdukció), illetve a génexpresszióban bekövetkező változásokat hő térképen ábrázoltuk (**8. B ábra**) és a **II. Kiegészítő táblázatokban** tüntettük fel. Azokat a géneket, amelyeknek a kifejeződése szignifikánsan megnőtt (≥ 2 -szeres változás), vagy szignifikánsan csökkent (≤ -2 -szeres változás), a **8. C ábra** mutatja be. Az egyszeri 8-oxoG kezelést követően a DS aktivációhoz és funkcióhoz köthető 95 génből (**I. Kiegészítő táblázatok**) 22 volt, amelyeknek az expressziója szignifikánsan megváltozott (**8. B ábra**). 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 (**8. C ábra**). A 8-oxoG

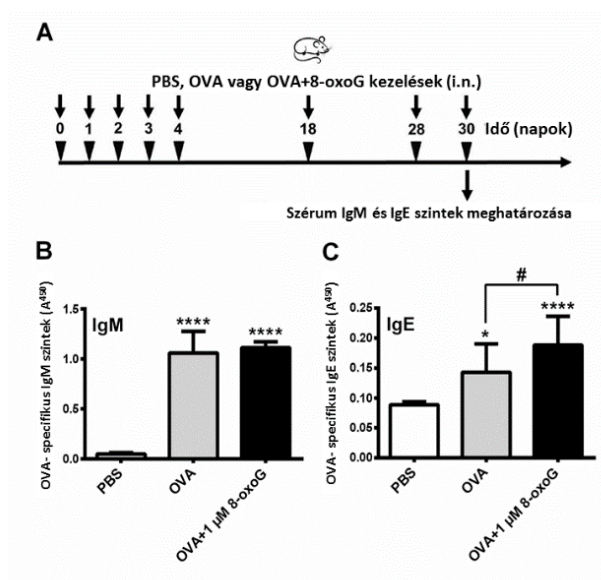
expozíció után a különböző időpontokban az egyszeri kezelés, vagy a többszöri kezelése után, illetve a mindkét típusú kezelést követően szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének számát Venn-diagramon mutatjuk be (8. D ábra). A legnagyobb mértékű változás a kifejeződött gének számában a többszöri kezelést követő 60. percnél volt megfigyelhető, ahol 22 egyedi és 12, az egyszeri kezeléssel átfedő gén expressziója változott megszignifikánsan (8. D ábra, II. Kiegészítő táblázatok). 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.



8. ábra: Egerekben a 8-oxoG által kiváltott génexpressziós változások összefüggnek a DS-ek aktivációjával. Nyolchetes nőstény BALB/c egereket ($n=5$ /csoport) egyszer (0. nap) vagy többször (0., 1. és 4. nap) intranázálisan 8-oxoG-nal kezelték. 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. A kezelés folyamatábrája az A paneleken látható. A „DS aktivációval” összefüggő géneket és klasztereiket hő térképen ábrázoltuk (B). Az oszlop diagramon (C) a szignifikánsan (≥ 2 -szeres vagy ≤ -2 szeres) megváltozott kifejeződésű gének láthatóak, mind az egyszeres, mind a többszöri 8-oxoG kezelést követően. Az egyszeri vagy a többszöri 8-oxoG kezelés után, illetve a mindkét típusú kezelést követően szignifikánsan megváltozott kifejeződésű gének számát Venn-diagramon mutatjuk be (D).

V.1.2 Az intranazális OVA-nal együtt adott 8-oxoG fokozza az OVA-specifikus IgE termelődését

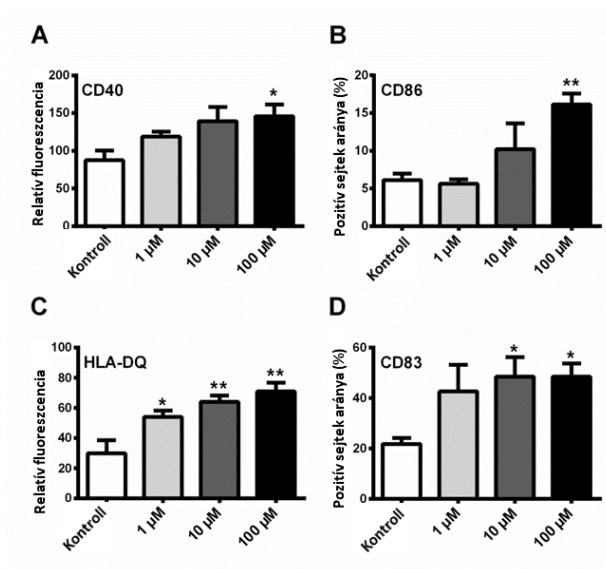
Korábban már kimutatták, hogy az OVA kezelés adjuváns használata nélkül is képes egerekben IgE-mediált allergiás légúti gyulladást kiváltani [86]. Mi is ezt a modellt alkalmazzuk, hogy megvizsgáljuk az OGG1 általi DNS BER folyamatok immunmoduláló hatását. Ahogy azt már leírták, az ismételt intranazális OVA kezelések (9. A ábra) hatására, az OVA-specifikus IgM és IgE antitestek szérumszintjei szignifikánsan megemelkedtek (9. B és C ábra). Amikor az OVA-t 8-oxo-G-nal kombinációban alkalmazzuk, a kezelés az OVA-specifikus IgM termelődést csak kis mértékben (9. B ábra), míg az OVA-specifikus IgE termelést szignifikánsan tovább fokozta (9. C ábra). Azon megfigyelések alapján, hogy a DS-ek általi antigén prezentáció elengedhetetlen a follikuláris segítő T sejtek (Tfh sejtek) differenciációjának beindításához [87], és a Tfh sejtek fontos szerepet töltenek be a légúti allergének elleni immunválaszok során létrejövő IgE antitestek termelődésében [88], eredményeink alátámasztják, hogy a 8-oxoG kiválthatja az egér légúti DS-ek aktiválódását.



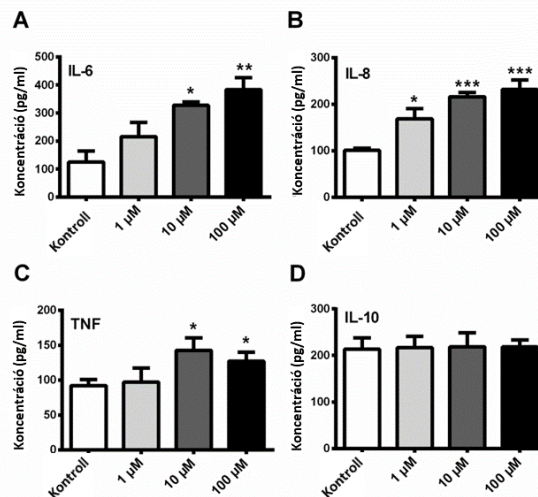
9. ábra: A 8-oxoG és az ovalbumin (OVA) együttes alkalmazása az OVA-specifikus IgE termelés fokozódását váltja ki Nyolchetas nőstény BALB/c egereket ($n=8$ /csoport) enyhe anesthesia mellett a 0-4., 18. és 28. napon intranazálisan kezeltük PBS, OVA vagy OVA+8-oxoG oldattal (A). A 30. napon az állatokat túlaltattuk, a szérumokat összegyűjtöttük, majd ELISA módszerrel meghatározzuk az OVA-specifikus IgM (B) és IgE (C) szintjeit. Az adatok három független mérés átlagát $\pm$ SD mutatják. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ vs PBS és # $p < 0.05$ vs. OVA

V.1.3 Az exogén 8-oxoG megváltoztatja a humán moDS-ek fenotípusát, valamint citokin és kemokin termelésüket

Az eger kísérletekből kapott eredmények alapján megvizsgáltuk, hogy a humán moDS-ekre milyen hatással lehet a 8-oxoG kezelés. Ennek vizsgalatához 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 (**10. A-D ábra**). 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 (**10. A-D ábra**). 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 (**11. A-D ábra**). A 8-oxoG kezelés koncentráció-függő módon fokozta a gyulladásos IL-6 és TNF- α citokinek, valamint az IL-8 kemokin mennyiségét (**11. A-C ábra**), azonban az anti-inflammatorikus IL-10 termelésére nem volt hatással (**11. D ábra**). 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.



10. ábra: A 8-oxoG kezelés a moDS-ek fenotípusos változását váltja ki. A humán moDS-eket növekvő koncentrációjú (1, 10 és 100 μ M) 8-oxoG-nal kezeltük 24 órán keresztül, majd áramlási citometriával meghatároztuk a CD40 (A), CD86 (B), HLA-DQ (C) és CD83 (D) sejtfelszíni markerek expresszióját. A relatív fluoreszcencia intenzitásokat, izotípus kontrollra normalizálva határoztuk meg. A feltüntetett adatok négy független kísérlet átlagát $\pm$ SD mutatják. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs kontroll.



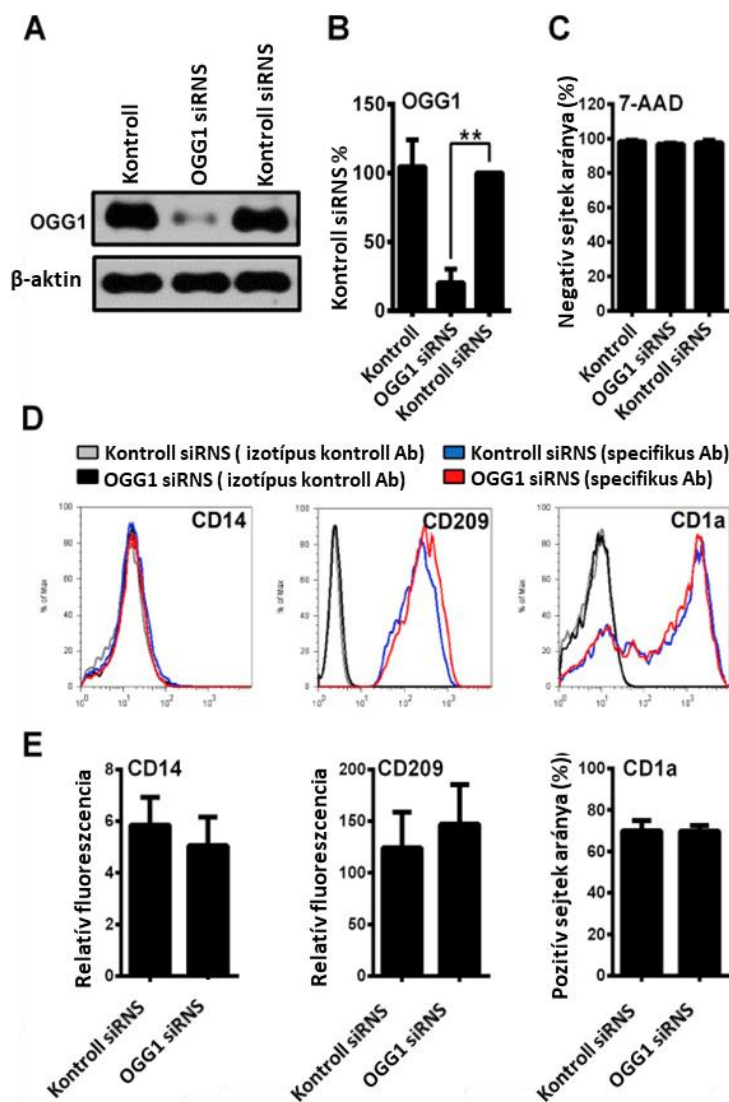
11. ábra: Az exogén 8-oxoG fokozza a moDS-ek citokin és kemokin termelését. Humán moDS-eket növekvő koncentrációjú 8-oxoG-nal kezeltük 24 órán keresztül, majd a sejtek felülírójából ELISA módszerrel meghatároztuk a szekretált IL-6 (A), IL-8 (B), TNF- α (C) és IL-10 (D) koncentrációját. Négy független mérés eredményeit ábráztuk (átlag $\pm$ SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs kontroll.

V.1.4 A humán moDS-ek 8-oxoG általi aktiváláshoz szükséges az OGG1 kifejeződése

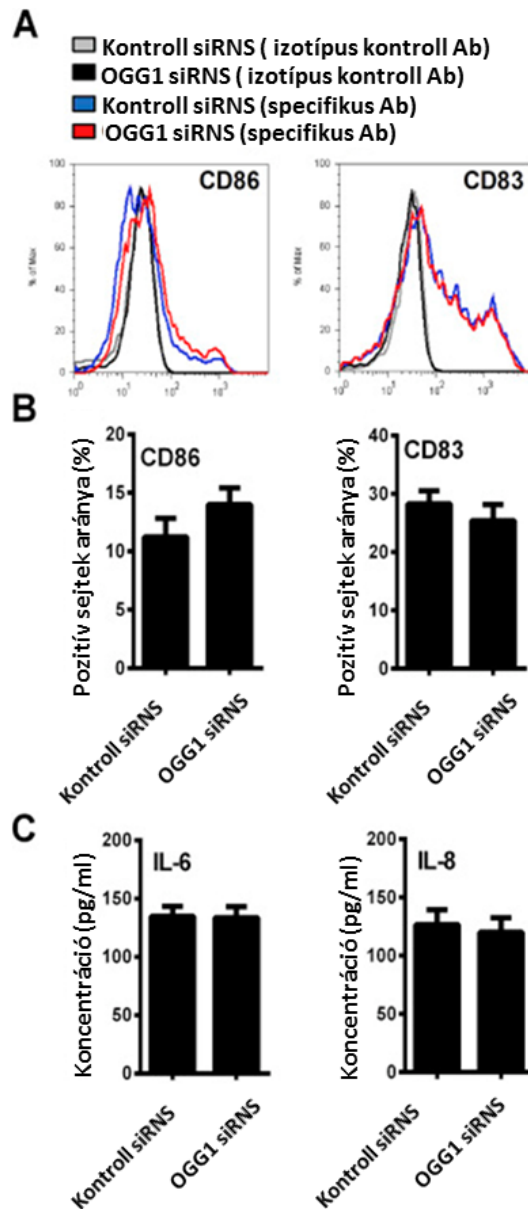
Annak bizonyítására, hogy az OGG1 szerepet játszik a humán moDS-ekben végbemenő, 8-oxoG által indukált fenotípusos és funkcionális változásokban, specifikus siRNS-sel csendesítettük a sejtek OGG1 expresszióját. A csendesítés hatékonyságát western blot analízissel ellenőriztük (12. A és B ábra). Az OGG1 specifikus siRNS ~80%-kal csökkentette a moDS-ekben az OGG1 expresszióját, a kezeletlen kontrollhoz és a kontroll siRNS kezeléshez képest (12. B ábra). Megvizsgáltuk 7-AAD festéssel a kezeléseknek 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 (12. C ábra).

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 (12. D és E ábra). Mindemellet sem a CD86 és CD83 aktivációs markerek kifejeződése (13. A, B ábra), sem pedig az IL-6 és IL-8 gyulladásos mediátorok (13. C ábra) 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

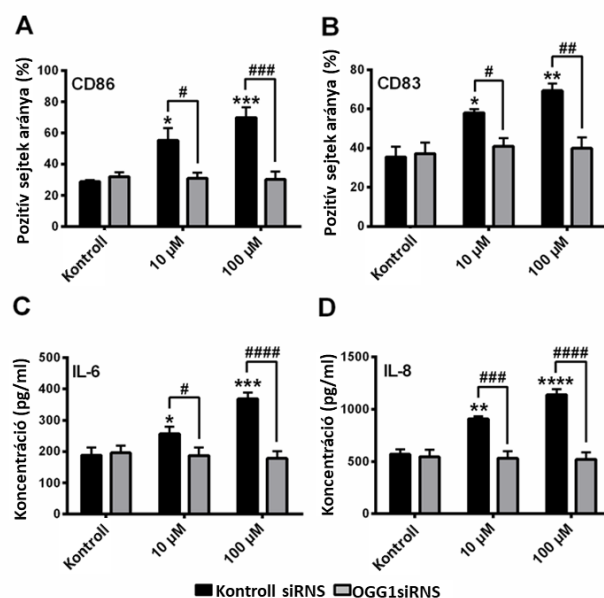
vizsgáltuk. Ehhez az előző kísérletekben (8. és 9. ábra) is alkalmazott koncentrációjú 8-oxoG-nal (10 μ M és 100 μ M) kezeltük az OGG1-csendesített moDS-eket. A kontroll siRNS-sel kezelt sejtekhez képest, az OGG1 csendesítése szignifikánsan csökkentette a 8-oxoG CD86 (14. A ábra) és CD83 (14. B ábra) kifejeződést fokozó, valamint az IL-6 citokin (14. C ábra) és az IL-8 kemokin (14. D ábra) termelődést növelő hatását. Ezek a megfigyelések alátámasztják hipotézisünket, miszerint az exogén 8-oxoG bázis OGG1-függő módon aktiválhatja a humán DS-eket.



12. ábra: Az OGG1 csendesítése nincs hatással sem a moDS-ek életképességére, sem a differenciálódási folyamataikra. Frissen izolált humán monocitákat (0. nap) OGG1-specifikus vagy kontroll siRNS-sel elektroporáltunk. (A) Az OGG1 csendesítés hatékonyságát az 5. napon western blot-tal vizsgáltuk. Négy független kísérletből származó blot-tok közül egy reprezentatív mutatunk be (B). Az oszlopdiagramokon az OGG1 csendesítés hatékonyságát mutatjuk a negatív kontroll siRNS-hez viszonyítva. Az ábrákon négy független kísérlet átlagai $\pm$ SD láthatóak. A sejtek életképességét (C), valamint sejtfelszíni CD14, CD209 és CD1a markerek expressziós szintjeit (D, E) áramlási citometriával vizsgáltuk. A négy független kísérletből származó reprezentatív hisztogramokat (D), valamint a kísérletek átlagai $\pm$ SD alapján készült oszlopdiagramokat mutatjuk be (C, E). Az adatokat egyutas ANOVA-t követő Bonferroni post-hoc teszttel értékeltük. ** $p < 0.01$ vs siRNS kontroll.



13. ábra: Az *OGG1* csendesítése nem befolyásolja a *moDS*-ek érését. Frissen izolált humán monocitákat (0. nap) elektroporáltunk *OGG1*-specifikus vagy kontroll siRNS-sel. Az *OGG1* csendesítés 5. napján áramlási citometriával megvizsgáltuk a CD86 és CD83 (A, B) sejtfelszíni érési markerek kifejeződését, valamint sejtfelülűszőből ELISA-val meghatároztuk az IL-6 és IL-8 gyulladásos citokin és kemokin koncentrációit (C). Az ábrán a négy független kísérletből származó reprezentatív hisztogram (A), valamint az oszlop diagramokon (B, C) a különálló kísérletek átlagának értékei $\pm$ SD láthatóak.



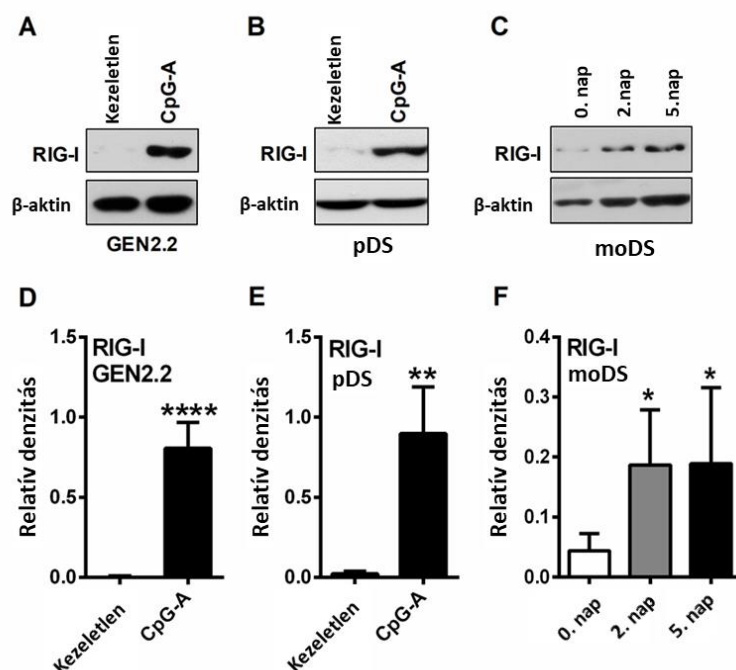
14. ábra: Az *OGG1* csendesítése meggátolja a humán *moDS*-ek 8-oxoG általi aktivációját. Frissen izolált humán monocitákat (0. nap) *OGG1*-specifikus és kontroll siRNA-sel elektroporáltuk. Az 5. napon a transzfektált *moDS*-eket 10 és 100 µM 8-oxoG-nal kezeltük 24 órán keresztül. A CD86 (A) és CD83 (B) sejtfelszíni expresszióját áramlási citometriával, míg a szekretált IL-6 (C) és IL-8 (D) szinteket a sejtek felülszóiából ELISA módszerrel határoztuk meg. A bemutatott adatok négy független kísérlet eredményeinek átlaga ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs kontroll; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ vs kontroll siRNA.

V.2 Az egyes humán dendritikus sejt altípusok eltérő anyagcsere változásokon mennek át a RIG-I-mediált aktivációjukat követően

V.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 [89,90]. Főbb megfigyeléseinket egészséges donorokból izolált, primer humán pDS-eken validáltuk. Ezek mellett perifériás vérből izolált monocitákból *in vitro* differenciált *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 [60] (15. A, D ábra). Nyugalmi állapotban a GEN2.2-höz hasonlóan, a primer pDS-ekben is nagyon alacsony szinten

expresszálódik a RIG-I [22], azonban CpG-A expozíciót követően szignifikánsan fokozódik a kifejeződése (**15. B, E ábra**). Ezzel ellentétben a moDS-ekben a differenciálójuk során fokozatosan megjelenik a RIG-I és az 5 napos éretlen moDS-ekben már stabil marad a kifejeződése (**15. C, F ábra**). Ezen megfigyelések alapján ez a két - a RIG-I-et eltérően kifejező - DS altípus potenciális modellként használható a RIG-I-indukált metabolikus változások tanulmányozására.



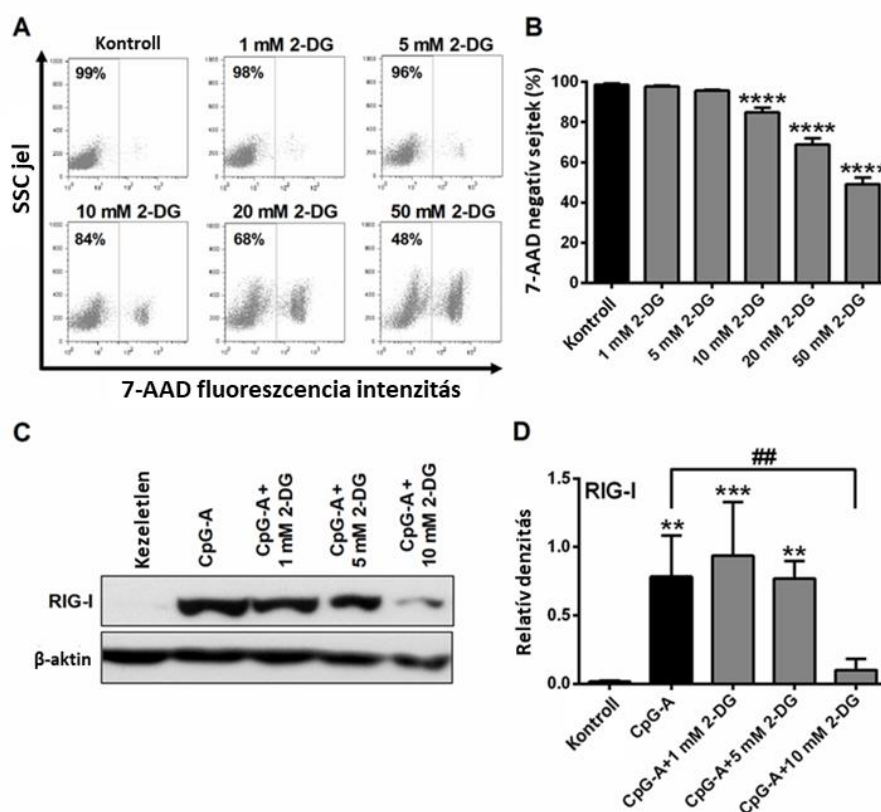
15. ábra: A RIG-I expressziójának vizsgálata különböző DS altípusokban. GEN2.2 sejteket (**A, D**) és primer humán pDS-eket (**B, E**) 0,25 μ M TLR9 agonista CpG-A-val kezeltünk 16-órán keresztül, majd western blot-tal meghatároztuk a RIG-I fehérje expresszióját. Frissen izolált, humán monocitákat IL-4 és GM-CSF jelenlétében differenciáltattuk, a RIG-I fehérje kifejeződését a 0., 2. és 5. napon western blot módszerrel határoztuk meg (**C, F**). A független kísérletből származó blot-tok közül egy-egy reprezentatív mutatunk be (**A-C**). A legalább 3 független kísérletből nyert adatokat (átlag $\pm$ SD) oszlopdiagramokon ábrázoltuk (**D-F**). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.00001$.

V.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 [44,46]. 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 (**16. A, B ábra**). 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 sejtenyészetekben.

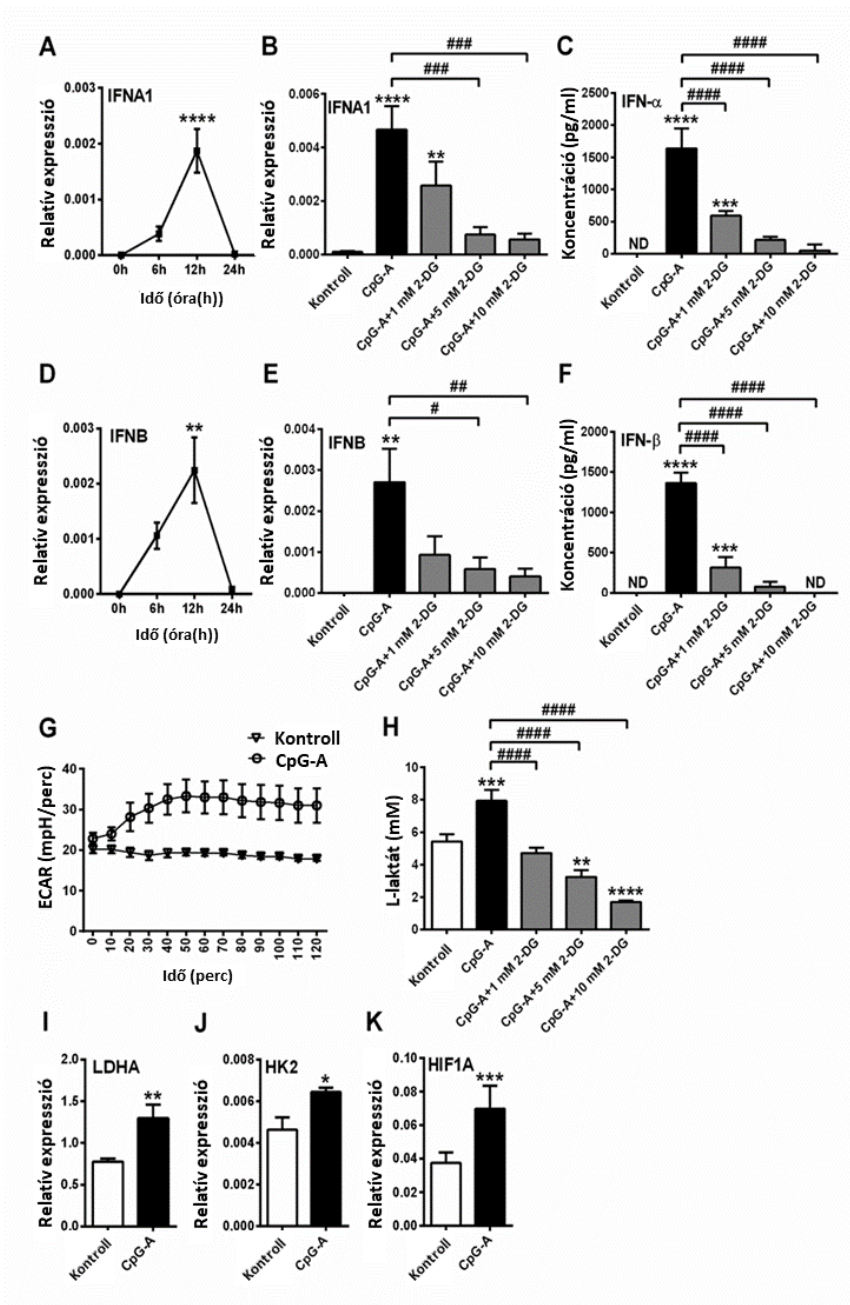
A glikolízis gátlás RIG-I expresszióra gyakorolt hatását megvizsgálva, kísérleteinkből kiderült, hogy az 1 és 5 mM koncentrációjú 2-DG nem befolyásolta a GEN2.2 sejtek CpG-A-indukált RIG-I expresszióját, míg a 10 mM-os koncentráció szignifikáns csökkenést okozott (**16. C, D ábra**). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a pDS-ekben a RIG-I expresszióját a glikolízis szabályozza.



16. ábra: A glikolízis gátlása befolyásolja a GEN2.2 sejtek életképességét és RIG-I expressziójukat. GEN2.2 sejteket növekvő koncentrációjú 2-deoxi-D-glükózzal (2-DG: 1-50 mM) kezeltünk, majd életképességüket áramlási citometriával ellenőriztük (**A, B**). A sejteket 0,25 μ M CpG-A-val, vagy CpG-A-val és növekvő koncentrációjú 2-DG-vel (1-10 mM) kombinációban kezeltük 16 órán keresztül, majd a RIG-I fehérje expresszióját western blot-tal határoztuk meg (**C, D**). A reprezentatív pont diagramokon (**A**) a százalékos értékek mutatják a 7-aminoactinomycin D (7-AAD) negatív sejtek arányát. Az oszlopdiagramon négy független kísérlet átlagát $\pm$ SD (**B**) mutatjuk. Az ábra alsó részén egy reprezentatív blot (**C**), illetve az oszlopdiagramon négy független kísérlet western blot eredményeinek átlaga $\pm$ SD (**D**) láthatóak. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. kontroll; ## $p < 0.01$.

V.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

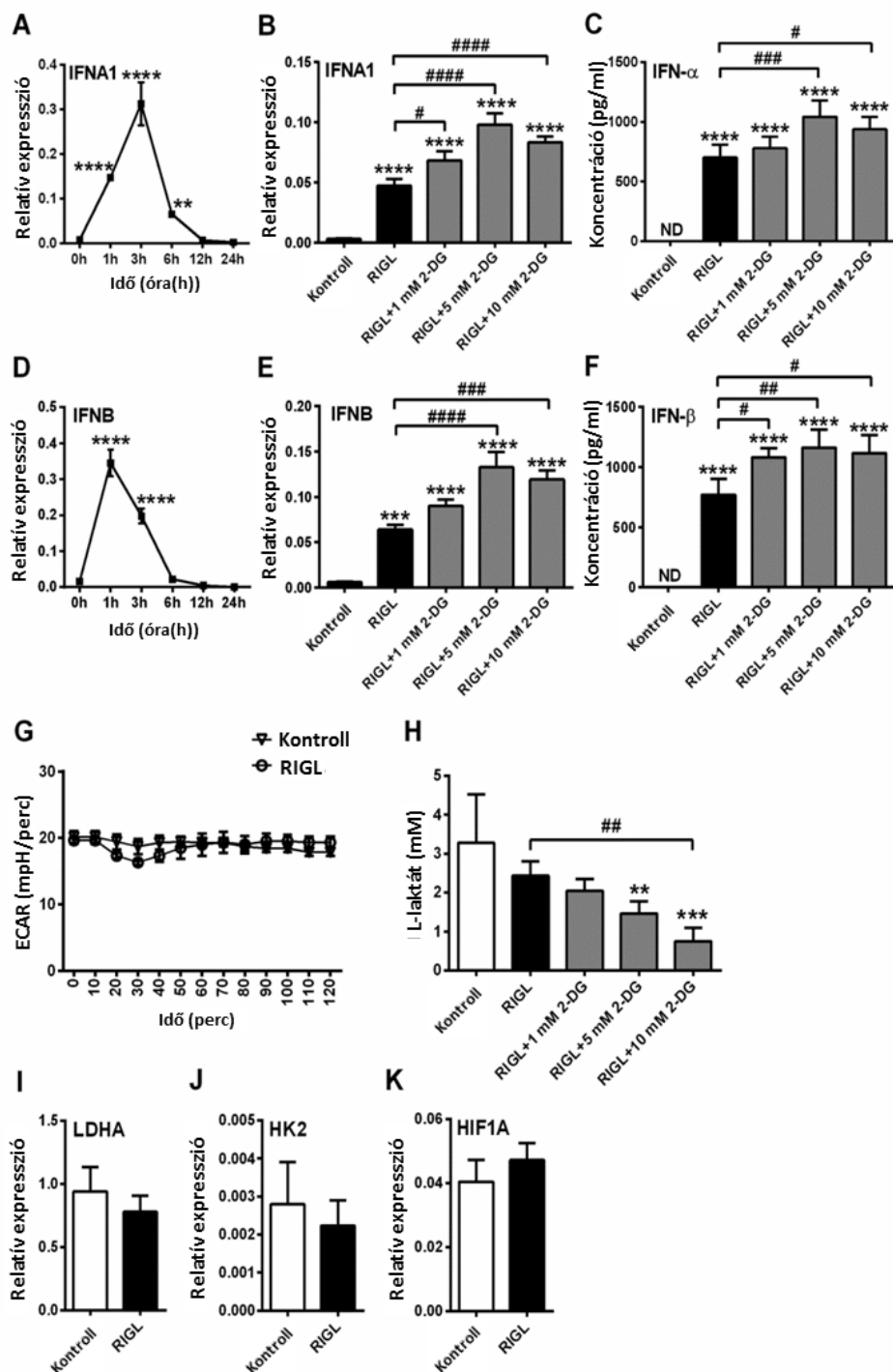
Munkacsoportunk már korábban leírta, hogy a virális nukleinsav felismerését követően, a pDS-ekben az I-es típusú IFN termelés két hullámban zajlik [22]. Az endoszómális TLR-ek a korai I-es típusú IFN termeléshez járulnak hozzá, míg a TLR stimuláció által indukált citoszolikus RLR-ek inkább a késői típusú 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. Az időkinetikai vizsgálataink eredményei szerint az *IFNA1* és *IFNB* gének kifejeződése a CpG-A kezelést követően 12 órával érte el a maximumát (**17. A, D ábra**), ezért a továbbiakban, ebben az időpontban vizsgáltuk a glikolízis hatását. A CpG-A-indukált IFN- α és IFN- β expresszió mind mRNS (**17. B, E ábra**), mind fehérje szinten (**17. C, F ábra**) szignifikánsan csökkent, amikor a sejteket 2-DG-zal kezeltük, ami a glikolízis fontos szerepére utal ebben a folyamatban. A glikolízis gátlószere önmagában, az alkalmazott koncentrációk egyikében sem váltott ki I-es típusú IFN termelést, ezért további kísérleteinkben ezt a kezelési kondíciót nem alkalmaztuk. A következőkben a glikolízis egyik indikátorát az extracelluláris savasodási rátát (ECAR) vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy a CpG-A kezelést követően a GEN2.2 sejtenyészetekben megnőtt az ECAR szintje (**17. G ábra**), Ezzel egyidejűleg emelkedett a sejtek laktát termelése is, ami 2-DG-zal gátolhatónak bizonyult, így szintén a sejtek fokozott glikolitikus aktivitására utal (**17. H ábra**). 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 (**17. I-K ábra**). Ezekből az eredményekből arra következtethetünk, hogy a GEN2.2 sejtekben az endoszómális TLR9 stimulációt követő I-es típusú IFN termeléshez szükség van glikolízisre.



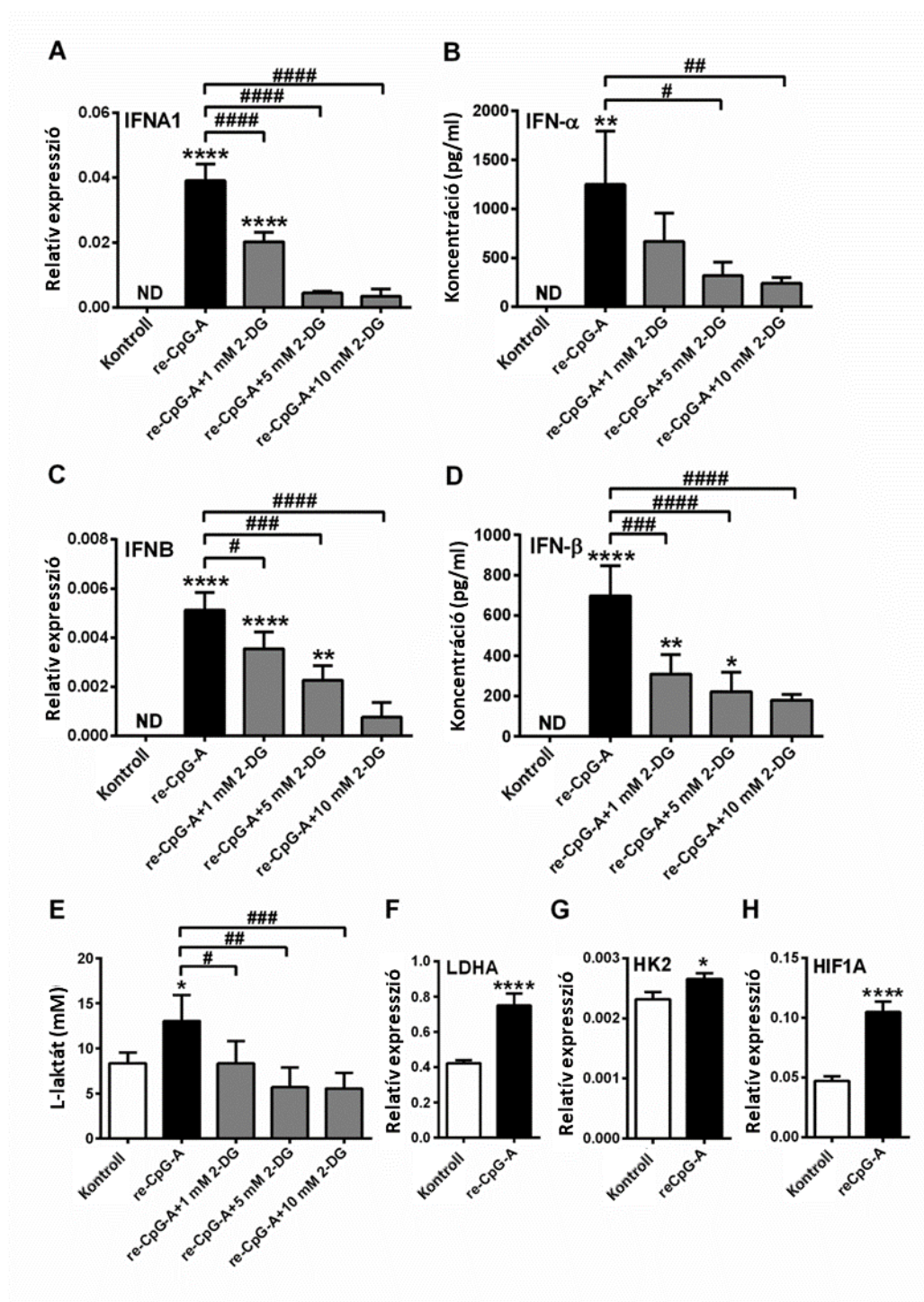
17. ábra: A glikolízis fokozódása nélkülözhetetlen a CpG-A kezelés által kiváltott I-es típusú IFN termeléshez GEN2.2 sejtekben. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-A-val kezeltük, majd a stimulust követően Q-PCR-rel megvizsgáltuk az IFNA1 és IFNB gének kifejeződését különböző időpontokban (A, D). A következőkben IFN- α és IFN- β szinteket határoztuk meg kezeletlen, 1 μ M CpG-A-val, vagy kombinációban CpG-A-val és növekvő koncentrációjú 2-DG-zal (1-10 mM) kezelt GEN2.2 sejteken (B, C, E, F). Az mRNA expressziót valós idejű-PCR-rel vizsgáltuk (B, E), a fehérje szintek meghatározását ELISA-val végeztük (C, F). A CpG-A aktivációt követően, a GEN2.2 sejtenyészetekben lejátszódó valós idejű extracelluláris savasodási rátát (ECAR) Seahorse XF96e Extracellular Flux analyzer készülékkel határoztuk meg. A mérésekből egy reprezentatív ábrát mutatunk be (H). A sejtfelülűsók laktát koncentrációját 12 órával a kezelést követően határoztuk meg. Az LDHA (I), a HK2 (J) és a HIF1A (K) gének kifejeződését mRNA szinten valós idejű PCR-rel vizsgáltuk. Az ábrákon 4-6 független kísérlet átlagai $\pm$ SD láthatóak. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. kontroll; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001, #### p <0.00001, ND, nem detektálható.

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 16 órán keresztül előkezeltük alacsony koncentrációjú CpG-A-val (0,25 μ M), így kiváltottuk a RIG-I citoszólikus expresszióját, majd egy mosási lépést követően a stimulált sejteket RIG-I-specifikus agonistával, 5'ppp-dsRNS-sel kezeltük. Ezt a korábban általunk kifejlesztett módszert, már sikeresen alkalmaztuk a pDS-ek RLR válaszainak tanulmányozására, mivel az alacsony dózisú CpG-A előkezelés nem okozza a sejtek kimerülését [22,90]. A pDS-ek RIG-I ligandummal történő kezelése sokkal gyorsabb I-es típusú IFN választ eredményez, mint a TLR9 ligandummal történő aktivációja. Az *IFNA1* és *IFNB* gének mRNS szintű expressziós maximuma a RIG-I stimulust követően 1-3 órával alakult ki, ezért a glikolízis gátlásának a hatását a 3 órás időpontban vizsgáltuk (**18. A, D ábra**). Érdekes módon a glikolízis 2-DG-zal történő gátlása szignifikánsan fokozta az 5'ppp-dsRNS-indukált IFN- α és IFN- β expressziót mind mRNS, mind fehérje szinten (**18. B, C, E, F ábra**). Azt is megfigyeltük, hogy a TLR9 aktivációval ellentétben az 5'ppp-dsRNS-sel aktivált pDS-ekben nem fokozódott az ECAR (**18. G ábra**), és nem növekedett sem a laktát termelés (**18. H ábra**), sem pedig a glikolízishez kapcsolódó gének expressziója (**18. I-K ábra**). 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.

Párhuzamos kísérletekben, alacsony dózisú CpG-A (0,25 μ M) előkezelést követően, RIG-I ligandum helyett a sejteket nagy dózisú CpG-A-val (1 μ M) aktiváltuk, hogy kizárjuk azt a lehetőséget, hogy a CpG-A előkezelés esetleg befolyásolja az azt követő stimulus energetikai igényeit. Megfigyeléseink szerint a GEN2.2 sejtek CpG-A re-stimulációt követő IFN- α termelése szintén glikolízis-függő folyamat (**19. ábra**). Amennyiben a glikolízist 2-DG-zal gátoltuk, a CpG-A re-stimulációt követő IFN- α és IFN- β expressziót mind mRNS, mind fehérje szinten alacsonyabb volt (**19. A, C ábra**). Ráadásul a második CpG-A stimulus fokozta a sejtek laktát termelését, amelyet a 2-DG gátolt (**19. E ábra**), és szignifikánsan fokozta az *LDHA*, *HK2* és *HIF1A* gének expresszióját (**19. F-H ábra**). Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a GEN2.2 sejtek korai, illetve kései TLR9 válaszát fokozott glikolízis jellemzi, míg a RIG-I-mediált jelátvitel független a glikolízistől.



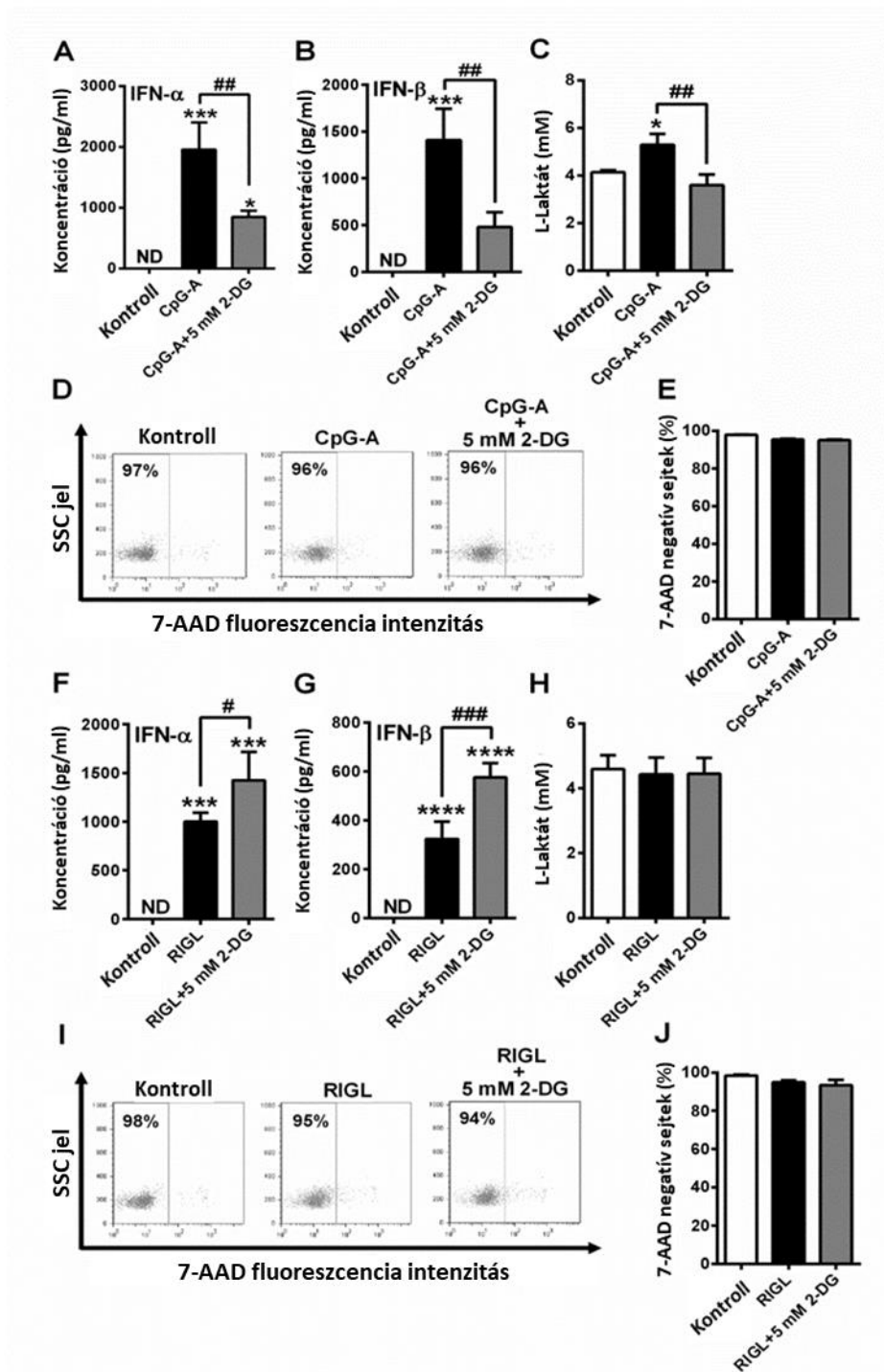
18. ábra: A glikolízis nem feltétele a GEN2.2 sejtek RIG-I-mediált I-es típusú IFN válaszáának. A GEN2.2 sejteket 16 óráig 0,25 μ M-os CpG-A előkezelés után mostuk, majd RIG-I agonista 5'ppp-dsRNS-sel (RIGL, 1 μ g/ml) kezeltük. Az IFNA1 és IFNB gének mRNS szintű kifejeződését Q-PCR-rel követtük nyomon (A, D). Kis dózisú CpG-A előkezelés után, a sejteket 5'ppp-dsRNS-sel önmagában vagy 2-DG-zal (1-10 mM) kombinációban kezeltük. A képződött IFN- α és IFN- β mRNS szintjeit valós idejű PCR-rel (B, E), a fehérje koncentrációkat pedig ELISA-val (C, F) határoztuk meg. Az 5'ppp-dsRNS-sel történő aktivációt követően, a valós idejű extracelluláris savasodási rátát (ECAR) Seahorse XF96e Extracellular Flux analyzer készülékkel határoztuk meg (G), a laktát koncentrációkat a felülírószókból mértük (H). Az LDHA (I), a HK2 (J) és a HIF1A (K) gének mRNS szintű expresszióját valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Az ábrákon 3 független kísérlet átlaga $\pm$ SD láthatóak. ** p <0.01, *** p <0.001, **** p <0.00001 vs. kontroll; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001, #### p <0.00001, ND, nem detektálható.



19. ábra: Egy második CpG-A expozíciót követő I-es típusú IFN termelés a GEN2.2 sejtekben szintén függ a glikolitikus aktivitástól. A GEN2.2 sejteket 0,25 μ M CpG-A-val előkezeltük 16 órán keresztül. Mosást követően újra stimuláltuk a sejteket 1 μ M CpG-A (re-CpG-A) önmagában vagy 2-DG-zal (1-10 mM) kombinációban, majd 12 óra elteltével meghatároztuk a sejtek IFNA1 és IFNB mRNS szintjeit valós idejű PCR-rel (A, C). A sejtek IFN- α és IFN- β termelését 12 órával a kezelés után ELISA módszerrel mutattuk ki. A sejtfelülszókban a laktát koncentrációt is ebben az időpontban mértük meg (E). Az LDHA (F), HK2 (G) és HIF1A (H) mRNS szinteket valós idejű PCR-rel határozzuk meg. Az oszlopdiagramokon négy egymástól független kísérlet átlagai $\pm$ SD láthatóak. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.0001 vs kontroll; # p <0.05, ## p <0.01, ### p <0.001, #### p <0.0001, ND, nem detektálható.

V.2.4 A TLR-indukált I-es típusú IFN válasz függ a glikolízistól, 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. A primer pDS-ek korlátozott száma miatt, azonban csak az 5 mM-os 2-DG koncentrációt használtuk, mely nem befolyásolta sem a GEN2.2 sejtek (**16. A, B ábra**), sem a primer humán pDS-ek életképességét (**20. D, E, I, J ábra**). 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 (**20. A, B ábra**), addig a RIG-I-mediált IFN- α és IFN- β termelést a glikolízis inhibitora inkább fokozta (**20. F, G ábra**). Mindezek mellett, a CpG-A-stimulált sejtek felülúszójában megnövekedett laktát szinteket lehetett detektálni, amit a 2-DG-zal történő együttes kezelés szignifikánsan csökkentett (**20. C ábra**). Ezzel ellentétben, a RIG-I stimulált pDS-ekben nem volt megfigyelhető a laktát szintek változása (**20. H ábra**), 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.

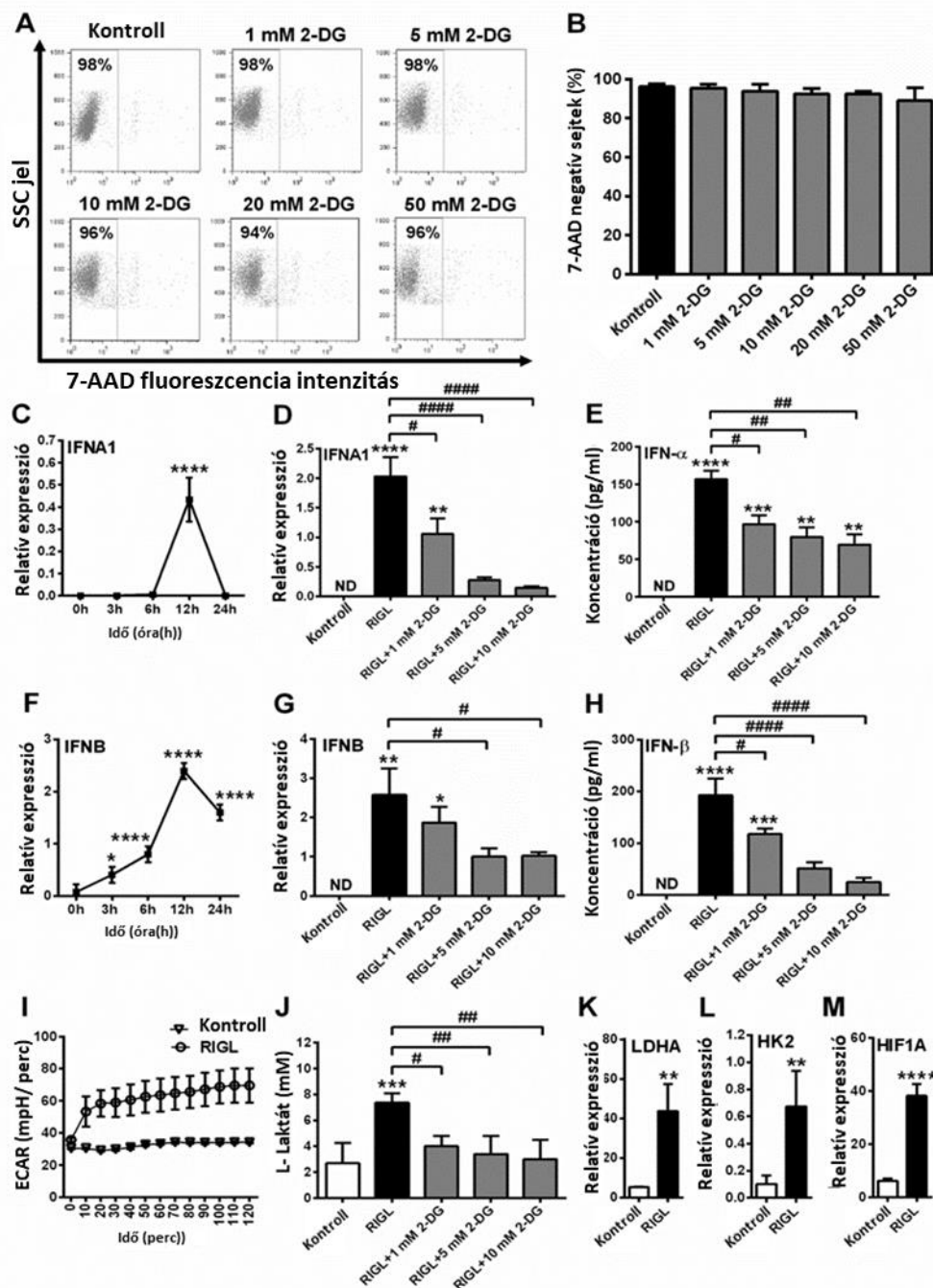


20. ábra: Az RLR stimulációval ellentétben a TLR-mediált aktivációt követő I-es típusú IFN termelés a glikolízistől függ a primer humán pDS-ekben. Frissen izolált, primer humán pDS-eket $1 \mu\text{M}$ CpG-A-val kezeltünk 2-DG (5 mM) jelenlétében vagy anélkül, majd 12 óra elteltével megvizsgáltuk a sejtek felülszójából a IFN- α és az IFN- β koncentrációját (A, B), valamint a laktát mennyiségét (C). Párhuzamos kísérletekben 16 órán keresztül alacsony dózisu CpG-A-val kezeltünk elő a sejteket. Mosást követően 5'ppp-dsRNS-sel önmagában (RIGL, $1 \mu\text{g/ml}$) vagy 5 mM 2-DG-zal kombinációban stimuláltuk a sejteket, majd hat órával a kezeléseket követően meghatároztuk a felülszókban lévő IFN- α és IFN- β fehérjék koncentrációját (F, G), valamint a termelődött laktát mennyiségét (H). A sejtek életképességét 7-aminoactinomycin D (7-AAD) jelölést követően, áramlási citometriával vizsgáltuk (D, E, I, J). A reprezentatív pont diagramon láthatók a 7-AAD negatív sejtek százalékos arányai. Az oszlopdiagramok (A-C, E, F-H, J) három egymástól független kísérletből származó eredmények átlagait $\pm$ SD mutatják be. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. kontroll; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, ND, nem detektálható.

V.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 (**21. A, B ábra**), 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 (**21. C, F ábra**), 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 (**21. D, G ábra**), valamint fehérje (**21. E, H ábra**) szinten is csökkent. Valós időben vizsgáltuk a RIG-I-stimulált moDS-ek metabolikus profilját is, mely során az ECAR gyors növekedését (**21. I ábra**) figyeltük meg, ami ellentétes a pDS-eknél tapasztaltakkal (**18. G ábra**). 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 (**21. J-M ábra**).

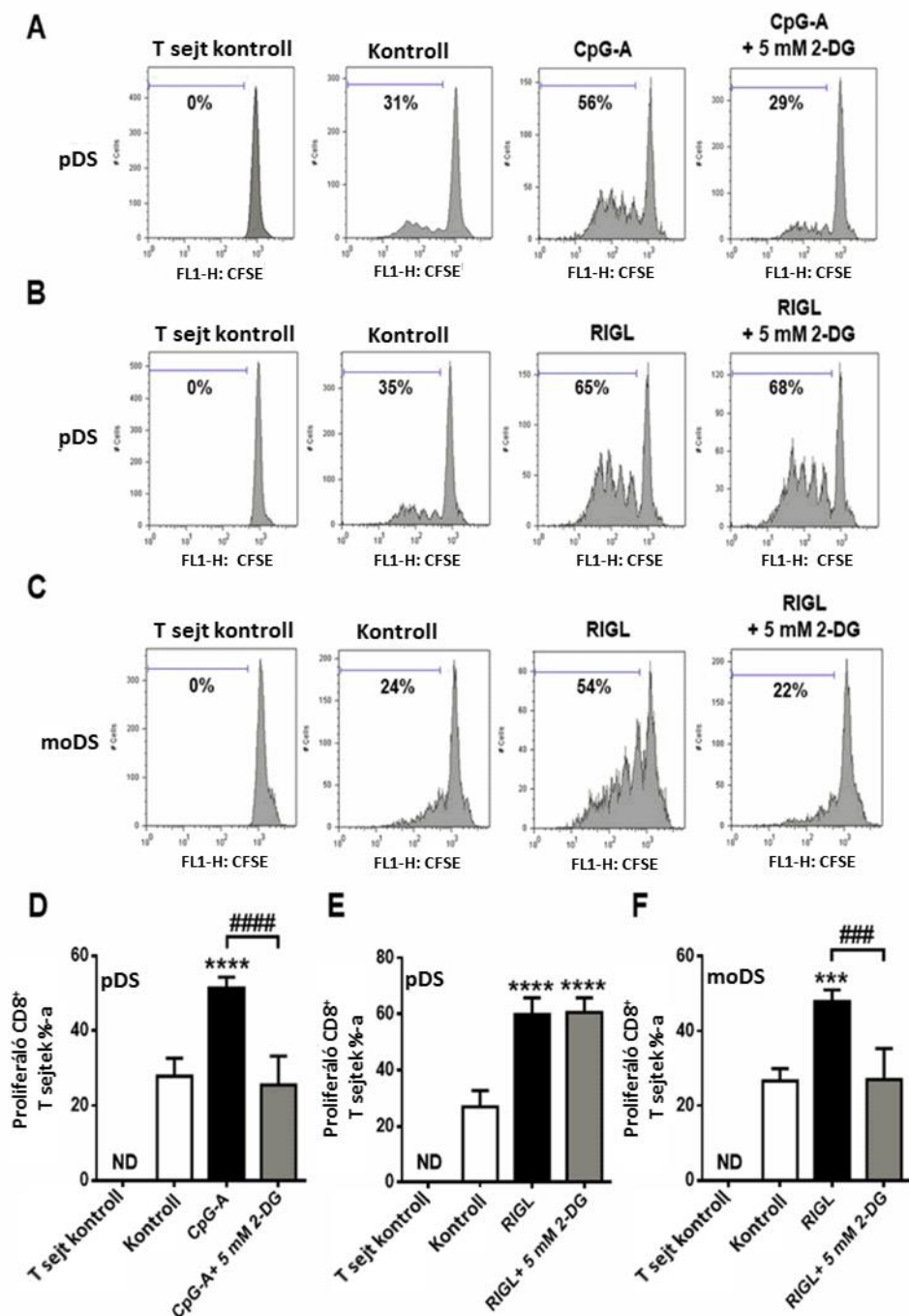


21. ábra: A moDS-ekben nélkülözhetetlen a glikolízis fokozódása a RIG-I-mediált I-es típusú IFN termeléshez. Éretlen moDS-eket növekvő koncentrációjú 2-DG-vel (1-50 mM) kezeltünk, majd áramlási citometriával vizsgáltuk az életképességüket (A, B). Az éretlen moDS-eket RIG-I agonista 5' ppp-dsRNS-sel (RIGL, 1 µg/ml) kezeltük, majd meghatároztuk az IFNA1 és IFNB mRNS expressziójának kinetikáját Q-PCR-rel (C, F). Ezzel párhuzamosan, moDS-eket 12 órán keresztül kezeltünk RIG-I ligandummal, 2DG jelenlétében (1-10 mM), majd az IFN-α és IFN-β mRNS szinteket valós idejű PCR-rel (D, G), a fehérje koncentrációkat ELISA-val (E, H) határoztuk meg. A RIG-I agonista 5' ppp-dsRNS-sel történő aktivációt követően, a moDS-ek valós idejű extracelluláris savasodási rátáját (ECAR) Seahorse XF96e Extracellular Flux analyzer készülékkel határoztuk meg (I). A felhúszók laktát koncentrációit 12 óra elteltével mértük (J). Az LDHA (K), a HK2 (L), és a HIF1A (M) gének kifejeződését mRNS szinten valós idejű PCR-rel határoztuk meg. Reprezentatív dot blot-okon láthatóak a 7-aminoactinocin D (7-AAD) negatív sejtek százalékban kifejezett értékei (A). A bemutatott eredmények négy egymástól függetlenül elvégzett kísérlet átlagai ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. kontroll; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, ND, nem detektálható.

V.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 [91]. Ezért vizsgálataink során tanulmányoztuk, hogy a DS-ek anyagszármazékok változásai milyen hatással vannak a T-sejt aktiváló képességükre. Ehhez nagy tisztaságú, allogén, naív CD8⁺ T sejteket primer humán pDS-ekkel, vagy moDS-ekkel tenyésztettünk együtt (**22. ábra**). 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 gátlható volt (**22. A, D ábra**). 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 (**22. B, E ábra**). 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 (**22. C, F ábra**). 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.



22. ábra: A TLR9-stimulált primer humán pDS-eknek és a RIG-I-aktivált moDS-eknek szükséges a glikolízis az allogén naív T-sejtek proliferációjának indukálásához, azonban a RIG-I aktivált pDS-eknek nem. CFSE-vel jelölt allogén, naív CD8⁺ T sejteket előkezelt pDS-ekkel vagy moDS-ekkel ko-kultúrában tenyésztettünk. Az ötödik napot követően, a sejtosztódást áramlási citometriával ellenőriztük (A-F). A reprezentatív hisztogramokon láthatók az élő, osztódó CD8⁺ T sejtek, melyek számát áramlási citometriával határoztunk meg (A-C). Az oszlopdiagramok mutatják a négy függetlenül végzett kísérlet átlagait $\pm$ SD. *** p <0.001, **** p <0.0001 vs kontroll; ### p <0.001, #### p <0.0001, 2-DG: 2-deoxi-D glükóz; ND, nem detektálható, RIGL, RIG-I ligandum.

VI. 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. Ezt követően a másodlagos nyirokszervekbe migrálnak, ahol kapcsolatba lépnek a naív T sejtekkel és beindítják azok aktivációját. Így a DS-ek nélkülözhetetlen szerepet játszanak a veleszületett és a szerzett immunválaszok összekapcsolásában. Az éretlen DS-ek a környezeti eredetű és endogén veszély és károsodási szignálok széles skáláját képesek felismerni [92] és differenciálódást, valamint érést követően azokra választ adni. A környezeti vagy a belső eredetű stimulust követően a DS-ek - más sejtekkel együtt - részt vesznek a gyulladásos válaszok elindításában is [93].

Az oxidatív stressz következtében termelődő mediátorok, illetve a kialakuló módosult molekulák biológiai hatását egyre szélesebb körben kutatják. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a pollen eredetű oxidatív stressz önmagában is képes kiváltani a moDS-ek aktiválását [94,95]. 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 [96]. Nemrégiben kimutattuk, hogy a magasabb 8-oxoG tartalmú, extracelluláris mitokondriális DNS-nek erős immunstimuláló hatása van a DS-ek egyik altípusában [97]. Jelen munkánk során azt vizsgáltuk, hogy a szabad 8-oxoG bázisnak, az OGG1-BER termékének, van-e immunmoduláló hatása a DS-ekre.

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 [81,84]. A transzkriptom analízise rávilágított arra, hogy mind az egyszeri, mind a többszörös 8-oxoG kezelés fokozta olyan gének kifejeződését, amelyek részt vesznek olyan biológiai folyamatokban, mint a homeosztázis fenntartása, az immunrendszer működése, a makrofágok aktivációja, ingerre adott válaszok és anyagcsere folyamatok [81,84]. Az immunrendszer folyamatai között számos olyan kemokin, citokin, interleukin, illetve jelátviteli molekula expressziója is fokozódott, amelyek a gyulladásos folyamatokban játszanak jelentős szerepet [81]. Ezek között az exogén 8-oxoG által módosított expressziójú gének között számos olyan lehet, amely befolyásolhatja a DS-k funkcióját, így hozzájárulhat az oxidatív stresszel

összefüggő gyulladásos válaszok kialakulásához. Ebből kiindulva, online adatbázisokat és irodalmi adatokat felhasználva kiválasztottunk 95 olyan gént, melyek bizonyítottan hatással vannak a DS-ek működésére. A korábbi transzkriptomelemzés 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 megjelentősen (22 a 95-ből). Ez nem meglepő az alapján, hogy a DS-ek aránya nagyon alacsony (körülbelül 1%) a tüdő összes sejtjéhez viszonyítva [98]. Ennek ellenére, több olyan gén expressziója is fokozódott, melyek a DS-ek funkciójához köthetőek mind a veleszületett, mind pedig a szerzett immunválaszok során. Mind a többszörös, mind az egyszeres 8-oxoG kezelés hatására megnövekedett például számos gyulladásos kemokin (*Ccl3*, *Ccl20*, *Cxcl1*, *Cxcl2*) és citokin (*IL1a*, *IL1b*, *IL6*, *Tnf*) génjének kifejeződése. A CCL3 és a CCL20 kemokinek irányítják a DS-ek migrációját, melyek aktiválást követően hatékony antigén prezentáló sejtekké válnak [99].

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 plazmasejtté történő átalakulását és elősegítik azok izotípus váltását [100]. Kísérleteinkben a DS-ek kis számára való tekintettel az exogén 8-oxoG DS-aktiváló hatását indirekt módon vizsgáltuk. A DS-ek aktiválódására a szérumban megjelenő allergén-specifikus immunglobulinok mennyiségének meghatározásából következtettünk. Ehhez az allergiás légúti gyulladásnak egy adjuváns használatát mellőző OVA modelljét alkalmaztunk. Habár több tanulmány eredménye is arra utal, hogy adjuváns alkalmazása nélkül, csupán az antigénnel való légúti szenzitizálás hatására, tolerancia alakul ki a rácsálókban, más vizsgálatok a légúti OVA szenzitizálási protokoll sikeres alkalmazhatóságáról számoltak be [101]. Ezekben a vizsgálatokban valószínűleg az OVA endotoxin szennyezése játszhatott közre a tolerancia áttörésében. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az LPS receptor deficiens egerekben adjuváns hiányában nem tud Th2 típusú válasz kialakulni [102]. Ezeket a korábbi megfigyeléseket alátámasztja, hogy a kísérleteinkben jelentős OVA-specifikus antitest termelést kiváltó OVA-ban (A5503, Sigma-Aldrich) is kimutatható endotoxin jelenléte (52 EU/mg, *Limulus* amöbocita lizátum assay alapján [103]). 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 [88]. OVA-nal és IL-33-mal kezelt egerekből Th2 és Tfh sejteket izoláltak, amelyeket intravénásan naív T-sejt deficiens (*Tcrb*^{-/-}) vagy IL-7 receptor α -lánc

deficiens (*Il7r^{-/-}*) egerekbe juttattak. Ezzel párhuzamosan, OVA-nal és IL-33-mal kezelt IL-4-IRES-eGFP (*4get*) riporter egereket kezeltek intranazálisan OVA-nal, hogy beazonosítsák a Th2 és Tfh sejtek anatómiai lokalizációját a 2-es típusú immunreakciók során. Ezekből a kísérletekből kiderült, hogy a Th2 sejtek a légutakba vándorolnak, és 2-es típusú citokinek termelésével légúti gyulladást váltanak ki, míg a Tfh sejtek a nyirokcsomókban maradnak, és segítik a plazmasejtek hosszú ideig tartó IgE termelését [88]. Egy másik tanulmányban olyan egereket használtak, amelyekben az MHC-II csak a konvencionális DS-ekben fejeződött ki, így nem volt jelen a B sejtek felszínén. Ezekben az egerekben a Tfh differenciáció kezdeti lépései - beleértve a CD4⁺ T sejtek Bcl6 és CXCR5 kifejező képességének beindítását és a B-sejt follikulusba történő migrációját -, egyértelműen a DS-ekkel való közvetlen kölcsönhatástól függtek [104]. Mások kimutatták, hogy a belélegzett dízel füst partikulumok (DFP-k) képesek a DNS guanin bázisainak oxidatív módosítására, mind egerek [105], mind pedig emberek esetén [106]. Ráadásul a DFP expozíció nem csak az OGG1-BER mechanizmusokat képes beindítani, hanem az IgE ellenanyag válaszokat is fokozza a neoantigénnel szemben [107]. A kizárólag neoantigénnel történő kezelést követően, a neoantigén-specifikus IgE antitestek nem voltak kimutathatóak. Ezzel szemben, ha a neoantigén kezelés DFP-mal együtt történt, az állatok többségében megjelentek az anti-neoantigén IgE ellenanyagok [107]. A DFP hatására kialakuló primer IgE válasz kivédhető volt, antioxidáns hatású tiolok alkalmazásával [108] és a II-es típusú antioxidáns enzimek indukálásával [109]. Ezek az előzetes megfigyelések, valamint az általunk végzett kísérletek eredményei együttesen felvetik annak lehetőségét, hogy kapcsolat lehet a tüdőben található DS-ek aktivációja és az OGG1-BER mechanizmusok között.

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 sejtfelszíni érési, ko-stimulációs és antigén prezentáló molekulák kifejeződésének fokozódása, illetve a megnövekedett gyulladáscitokin termelés is alátámasztott. Az IL-10 citokin szekréciója nem változott, ezért feltételezzük, hogy a DS-ek által mediált anti-inflammatórikus folyamatokra a 8-oxoG kezelés nincs hatással.

Nemrégiben kimutatták, hogy a 8-oxoG az OGG1-gyel komplexet képezve kis molekulasúlyú GTPázok aktivációját és ezzel többféle jelátviteli útvonal beindítását képes kiváltani a sejtekben [74,76,78]. A kis molekulasúlyú GTPázoknak számos DS funkció, mint a differenciáció [110,111], endocitózis [112], érés [113,114], kemotaxis [112], antigén prezentáció [112], keresztprezentáció [115–117], T-sejt polarizáció szabályozásában is szerepük van [118]. 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. Korábban az is kiderült, hogy a kis GTPázok sejttípustól függően pozitív és negatív szabályozó szerepet is betölthetnek az NF- κ B aktivációjában [119]. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a kis GTPázoknak, mint a Rac1-nek és RhoG-nek, gén expressziót szabályozó szerepük van. Ez elsősorban a MAPK, PI3K kaszkád beindításának képességét jelenti, ami aztán az NF- κ B jelátviteli út aktiválásához vezet [120–122]. Nemrégiben írták le, hogy az OGG1-BER terméke, a 8-oxoG bázis, képes a légúti hámsejtekben a KRAS, PI3K, MAPK és a mitogén-stresszel összefüggő kinázon (MSK) keresztül, a kanonikus NF- κ B útvonal aktiválására és ezzel egyidejűleg a gyulladásos mediátorok expressziójának fokozására [75]. Ezen előzetes megfigyelések alapján azt feltételeztük, hogy az exogén 8-oxoG-nal kiváltott DS aktiváció összefüggésben áll a kis molekulásúlyú GTPázok OGG1 mediált aktivációjával. 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 az 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 [80,123,124]. Az OGG1 csendesítésével ugyanis mind az NF- κ B és a promóter szekvenciák közötti kapcsolat, mind pedig a sejtek TNF stimulációra adott transzkripciós válasza csökken. Ugyanakkor, 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 inertként viselkednek [125].

Az OGG1-nek fontos szerepe van a genom integritásának fenntartásában, ám emellett az enzim működését több gyulladásos betegséggel is összefüggésbe hozták [126]. Az OGG1 mediált jelátvitel például fokozza az allergiás gyulladás intenzitását [64], míg az OGG1 gén polimorfizmusa kapcsolatban van a rheumatoid arthritis progressziójával [127]. 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 [128]. Eredményeink szerint 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, beleértve a DS-eket is, stimulációt követően metabolikus váltáson mennek keresztül. Ennek a folyamatnak nélkülözhetetlen szerepe van az aktiváció hiánytalan és teljes lezajlásában [13,129]. Különösen igaz ez a TLR agonisták hatására, aminek következtében a cDS-ek és a moDS-ek OXPHOS-ból glikolízisre váltanak át. Ennek gátlása megakadályozza aktivációjukat és hatással van az életképességükre is [44,47,130]. Az irodalomban azonban ellentmondásos adatok vannak arról, hogy az endoszómális TLR aktivációt követően milyen metabolikus folyamatok zajlanak le a pDS-ekben, illetve arról, hogy a metabolikus változások hogyan befolyásolják a pDS-ek működését [46,131]. Még kevesebbet tudunk a sejtek 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 annak érdekében, hogy kielégíthessék a növekedésükhöz szükséges energiaigényüket [132]. Ezt a jelenséget ma Warburg mechanizmusnak nevezzük. Feltételezzük, hogy a T sejtekben is hasonló folyamatok zajlanak le proliferációjuk és effektor sejtekké differenciálódásuk során [133]. Ezzel ellentétben, a veleszületett immunitás sejtjeinél, beleértve a makrofágokat és a DS-eket is, a Warburg mechanizmus a funkcionális változásokat, mint például a citokin termelést segíti [13].

A glikolízis fontos szerepét a TLR mediált DS aktiváció során először Jantsch és munkatársai figyelték meg [47]. Leírták, hogy az egér csontvelő eredetű dendritikus sejtek (BM-DS-ek) TLR4 mediált aktivációjának fontos szabályozó molekulája a HIF-1 α . Egy másik tanulmányban kimutatták, hogy az egér BM-DS-ek TLR2, TLR4 és TLR9 ligandummal való stimulációja aerob glikolízist váltott ki, amit a mitokondriális aktivitás és az OXPHOS csökkenése kísért [44]. Az is kiderült, hogy ezt a metabolikus váltást a PI3K/Akt jelátviteli útvonal támogatja, ezzel szemben az adenosin monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK), mely az OXPHOS-t szabályozza, illetve az anti-inflammatorikus IL-10 citokin is gátolja. Később az is világossá vált, hogy a BM-DS-ek TLR által kiváltott, korai glikolitikus váltását a TANK-kötő kináz 1 (TBK1), az I κ B kináz ϵ (IKK ϵ) és az Akt mediálja, azzal hogy segítik a glikolitikus hexokináz 2 enzim mitokondriumhoz való kapcsolódását [48]. A hosszútávú glikolitikus elköteleződést a mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) szabályozza, a HIF1 α és az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) expresszió

fokozásával [134]. A szerzők azt is felvetették, hogy a hosszútávú glikolitikus elköteleződés csak egy túlélési mechanizmus az iNOS-t kifejező sejtek számára, amelyben a NO termelés gátolja a mitokondriális elektron transzportláncot [134]. Mindazonáltal, egerekben egy korai glikolitikus aktivitás fokozódást szükségesnek tartanak az iNOS-t még nem kifejező DS-ek aktivációjához. Ezt azzal igazolták, hogy a 2-DG, a HK2 gátlószere, képes az aktiváció korai fázisában gátolni a BM-DS-ek TLR4 mediált aktivációját, érését és citokin termelését [44,48]. Ezen kívül azt is feltételezik, hogy a TLR-aktivált DS-ekben a glikolízis gyors fokozódása a zsírsavak citrátból történő *de novo* szintézisét segíti, azzal a céllal hogy támogassa a citokinek és más fehérjék szintéziséhez és szekréciójához szükséges organellemek kiterjedését [48].

Az egér BM-DS-ekhez hasonlóan a humán pDS-ekben is kimutatták, hogy antivirális funkcióik kialakításához glikolízisre váltanak [46]. Az ssRNS vírus vagy gardiquimod kezelés hatására a humán pDS-ekben megnőtt a HIF-1 α fehérje expressziós szintje, fokozódott a glikolízis, miközben az OXPHOS aktivitása csökkent. Ezen felül, mikor 2-DG-zal blokkolták a glikolízist, a humán pDS-ekben csökkent a TLR7-indukált IFN- α szekréció, ami igazolta a glikolízis fontosságát a humán pDS-ek antivirális válaszaiban. Egy másik tanulmányban kimutatták, hogy patológiás körülmények között, mint például az imiquimod-indukált kontakt dermatitisben, mind a humán, mind az egér pDS-ek imiquimoddal történő aktivációja az oxigénfogyasztási ráta (oxygen consumption rate, OCR) csökkenését és az ECAR növekedését okozta, habár más TLR7/8 agonistával, például gardiquimoddal vagy R848-cal történő kezelés esetében ez nem volt megfigyelhető [136]. A kísérleteinkben mi is azt figyeltük meg, hogy a humán pDS-ek CpG-A-val történő aktivációja fokozza a sejtek glikolitikus aktivitását, amit a megnövekedett ECAR, fokozott laktát termelés, valamint a glikolitikus gének megemelkedett expressziója tükröz. Sőt mi több, a 2-DG képes volt szignifikánsan gátolni a TLR9-indukált I-es típusú IFN termelést, ezáltal bizonyítva a glikolízis fontos szerepét a humán pDS-ek antivirális funkcióinak kialakításában. Az általunk megfigyeltekkkel ellentétben Wu és munkatársai azt tapasztalták, hogy az egér pDS-ek TLR9 mediált aktivációja következtében létrejövő metabolikus változásokat a fokozott OXPHOS és zsírsav oxidáció jellemezte, amelyek függték az I-es típusú IFN termeléstől [131]. Sőt, egér pDS-ekben az I-es típusú IFN kezelés önmagában fokozta az OXPHOS-t és a zsírsav oxidációt [131]. A szerzők azt is megfigyelték, hogy az imiquimoddal stimulált pDS-ek és TLR3/MDA5 ligandum polyI:C-vel aktivált BM-DS-ek alap OCR-je emelkedett [131]. Ezzel ellentétben, az *in vivo* polyI:C-vel stimulált egér DS-ekben aerob glikolízis irányába történő metabolikus váltás zajlott, amit az I-es típusú IFN-ok szabályoztak [137].

Jelenlegi tudásunk szerint, eddig csak egy tanulmányban vizsgálták a sejtek metabolizmusa és az RLR mediált jelátvitel közti kapcsolatot [135]. 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-vel történő gátlása megzavarja az RLR mediált jelátvitelt a HEK293 sejtekben [135]. 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 [130]. Ellentétben az érett egér BM-DS-eken megfigyeltekkel, ahol a váltás az OXPHOS teljes mértékű blokkolásához vezet, így az energiatermelés és a sejtek túlélése teljes mértékben a glikolízistől függ [134], az érett humán moDS-ekben egy kismértékű OXPHOS aktivitást továbbra is megmarad, amely energiát szolgáltat számukra [130]. 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, hogy az érett és éretlen moDS-ek hasonló szintű iNOS expressziót és NO termelést mutatnak, ami felveti, hogy az egér DS-ekkel szemben [134], a humán moDS-ekben a TLR-indukált csökkenés a mitokondriális aktivitásban független az NO-tól [130]. Kimutattuk, hogy a pDS-ekkel ellentétben, a humán moDS-eket ha RIG-I mediált módon stimuláljuk, fokozódik a laktát termelésük, a glikolízissel összefüggő génjeik expressziója, illetve magasabb szintű ECAR lesz detektálható. A glikolízis gátlása 2 DG-vel ezekben a sejtekben megakadályozta az I-es típusú IFN termelését, ami arra utal, hogy ez a

folyamat inkább glikolitikus anyagcserét igényel, mint OXPHOS-t. Érdekes módon, a glikolízis blokkolása - a moDS-ekkel ellentétben - a pDS-ekben fokozta a RIG-I által kiváltott I-es típusú IFN termelést. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a moDS-ekkel ellentétben a pDS-ekben a glikolitikus rendszer károsodása segíti az OXPHOS aktivitását, ami fokozódó mtROS termeléshez vezethet. Korábban már leírtuk, hogy a fokozott mtROS szint segíti a pDS-ek RIG-I mediált válaszkészségét [60], 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 [48]. 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 allogen 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 első 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 [48]. Eredményeink alapján, a DS-ek anyagcseréjének manipulálásával ezeknek a sejteknek az immunpolarizáló tulajdonságait is módosíthatjuk.

VII. 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.

VIII. 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 szerepe mellett 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) citoszólikus 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 válaszai 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.

Summary

A growing body of evidence suggests that elevated levels of reactive oxygen species (ROS) in the airways are able to activate dendritic cells (DCs); however, the exact mechanisms are still unclear. When present in excess, ROS can modify macromolecules including DNA. One of the most abundant DNA base lesions is 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG), which is repaired by the 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1)-initiated base excision repair (BER) (OGG1-BER) pathway. Studies have also demonstrated that in addition to its role in repairing oxidized purines, OGG1 has guanine nucleotide exchange factor activity when bound to 8-oxoG. In this work, we provide indirect evidence that exposure to 8-oxoG, the specific product of OGG1-BER, induces functional changes of DCs in the lung of mice. Furthermore, we demonstrate that exposure of primary human monocyte-derived DCs (moDC) to 8-oxoG base resulted in significantly enhanced expression of cell surface molecules (CD40, CD86, CD83, HLA-DQ) and augmented the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines. The stimulatory effects of 8-oxoG on human moDCs were abolished upon siRNA-mediated OGG1 depletion.

Several reports indicate that Toll-like receptor (TLR) stimulation of DCs is accompanied by a rapid induction of glycolysis; however, the metabolic requirements of retinoic-acid inducible gene I (RIG-I) receptor activation have not defined either in conventional DCs (cDCs) or in plasmacytoid DCs (pDCs), the major producers of type I interferons (IFN) upon viral infections. To sense viruses and trigger an early type I IFN response, pDCs rely on endosomal TLRs, whereas cDCs employ cytosolic RIG-I, which is constitutively present in their cytoplasm. We previously found that RIG-I is upregulated in pDCs upon endosomal TLR activation and contributes to the late phase of type I IFN responses. Here we report that TLR9-driven activation of human pDCs leads to a metabolic transition to glycolysis supporting the production of type I IFNs, whereas RIG-I-mediated antiviral responses of pDCs do not require glycolysis and rather rely on oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity. Moreover, pDCs activated via TLR9 but not RIG-I in the presence of 2-deoxy-D-glucose (2-DG), an inhibitor of glycolysis, are impaired in their capacity to prime allogeneic naïve CD8⁺ T cell proliferation. Interestingly, human moDCs triggered via RIG-I show a commitment to glycolysis to promote type I IFN production and T cell priming in contrast to pDCs. Our findings reveal for the first time that RIG-I-induced metabolic alterations are rather cell type-specific and not receptor-specific events.

IX. Referenciák

- [1] Y. Zhang, C. Liang, Innate recognition of microbial-derived signals in immunity and inflammation, *Sci. China Life Sci.* 59 (2016) 1210–1217. doi:10.1007/s11427-016-0325-6.
- [2] K. Vijay, Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future, *Int. Immunopharmacol.* 59 (2018) 391–412. doi:10.1016/j.intimp.2018.03.002.
- [3] R. Nowarski, N. Gagliani, S. Huber, R.A. Flavell, Innate immune cells in inflammation and cancer, *Cancer Immunol. Res.* 1 (2013) 77–84. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0081.
- [4] X. Wang, H. Peng, J. Cong, X. Wang, Z. Lian, H. Wei, R. Sun, Z. Tian, Memory formation and long-term maintenance of IL-7R α + ILC1s via a lymph node-liver axis, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–12. doi:10.1038/s41467-018-07405-5.
- [5] J. Dominguez-Andres, M.G. Netea, Long-term reprogramming of the innate immune system, *J. Leukoc. Biol.* 105 (2019) 329–338. doi:10.1002/JLB.MR0318-104R.
- [6] I. Mellman, Dendritic cells: master regulators of the immune response, *Cancer Immunol. Res.* 1 (2013) 145–149. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0102.
- [7] D. Tang, R. Kang, C.B. Coyne, H.J. Zeh, M.T. Lotze, PAMPs and DAMPs: signals that spur autophagy and immunity, *Immunol. Rev.* 249 (2013) 158–175. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.PAMPs.
- [8] G. Dranoff, Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 11–22. doi:10.1038/nrc1252.
- [9] R. Steinman, B. Harbor, Identification of a novel cell type in peripheral organs of mice, *J. Exp. Med.* 137 (1973) 1142–1162.
- [10] J.M. Austyn, Dendritic Cells in the Immune System—History, Lineages, Tissues, Tolerance, and Immunity, *Microbiol. Spectr.* 4 (2016). doi:10.1128/microbiolspec.mchd-0046-2016.
- [11] D. Mittag, A.I. Proietto, T. Loudovaris, S.I. Mannering, D. Vremec, K. Shortman, L. Wu, L.C. Harrison, Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status, *J. Immunol.* 186 (2011) 6207–6217. doi:10.4049/jimmunol.1002632.
- [12] M. Collin, V. Bigley, Human dendritic cell subsets: an update, *Immunology.* 154 (2018) 3–20. doi:10.1111/imm.12888.

- [13] E.J. Pearce, B. Everts, Dendritic cell metabolism, 15 (2015) 18–29. doi:10.1038/nri3771.Dendritic.
- [14] D. Pakalniškytė, B.U. Schraml, Tissue-Specific Diversity and Functions of Conventional Dendritic Cells, *Adv. Immunol.* 134 (2017) 89–135. doi:10.1016/bs.ai.2017.01.003.
- [15] H.S. Li, S.S. Watowich, A STATus report on DC development, *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012) 445–459. doi:10.1189/jlb.0212052.
- [16] I. Sasaki, T. Kaisho, Transcriptional Control of Dendritic Cell Differentiation, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (2014) 257–78. doi:10.1007/82_2014_378.
- [17] G.E. Grajales-Reyes, A. Iwata, J. Albring, X. Wu, R. Tussiwand, W. Kc, N.M. Kretzer, C.G. Briseño, V. Durai, P. Bagadia, M. Halder, J. Schönheit, F. Rosenbauer, T.L. Murphy, K.M. Murphy, Batf3 maintains autoactivation of Irf8 for commitment of a CD8 α + conventional DC clonogenic progenitor, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 708–717. doi:10.1038/ni.3197.
- [18] T.A. Patente, M.P. Pinho, A.A. Oliveira, G.C.M. Evangelista, P.C. Bergami-Santos, J.A.M. Barbuto, Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–18. doi:10.3389/fimmu.2018.03176.
- [19] H.S. Li, C.Y. Yang, K.C. Nallaparaju, H. Zhang, Y.J. Liu, A.W. Goldrath, S.S. Watowich, The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development, 2012. doi:10.1182/blood-2012-07-441311.
- [20] M. Otsuka, G. Egawa, K. Kabashima, Uncovering the Mysteries of Langerhans Cells, Inflammatory Dendritic Epidermal Cells, and Monocyte-Derived Langerhans Cell-Like Cells in the Epidermis, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1768. doi:10.3389/fimmu.2018.01768.
- [21] T.P. Singh, H.H. Zhang, I. Borek, P. Wolf, M.N. Hedrick, S.P. Singh, B.L. Kelsall, B.E. Clausen, J.M. Farber, Monocyte-derived inflammatory Langerhans cells and dermal dendritic cells mediate psoriasis-like inflammation, *Nat. Commun.* 7 (2016) 1–18. doi:10.1038/ncomms13581.
- [22] A. Szabo, Z. Magyarics, K. Pazmandi, L. Gopcsa, E. Rajnavolgyi, A. Bacsí, TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner, *Immunol. Cell Biol.* 92 (2014) 671–678. doi:10.1038/icb.2014.38.
- [23] A. Cerutti, X. Qiao, B. He, Plasmacytoid dendritic cells and the regulation of immunoglobulin heavy chain class switching, *Immunol. Cell Biol.* 83 (2005) 554–562. doi:10.1111/j.1440-1711.2005.01389.x.

- [24] D. Mitchell, S. Chintala, M. Dey, Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer, *J. Neuroimmunol.* 322 (2018) 63–73. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.06.012.
- [25] L. Yang, P. Mali, C. Kim-Kiselak, G. Church, NLR Proteins, 2016. doi:10.1007/978-1-4939-3566-6.
- [26] L. Chen, L.A. Dipietro, Toll-like receptor function in acute wounds, *Adv. Wound Care.* 6 (2017) 344–355. doi:10.1089/wound.2017.0734.
- [27] T. Toubai, N.D. Mathewson, J. Magenau, P. Reddy, Danger signals and graft-versus-host disease: Current understanding and future perspectives, *Front. Immunol.* 7 (2016) 1–15. doi:10.3389/fimmu.2016.00539.
- [28] R. Soysa, X. Wu, I.N. Crispe, Dendritic cells in hepatitis and liver transplantation, *Liver Transplant.* 23 (2017) 1433–1439. doi:10.1002/lt.24833.
- [29] D. Bernardo, M. Chaparro, J.P. Gisbert, Human Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases, *Mol. Nutr. Food Res.* 62 (2018) 1–8. doi:10.1002/mnfr.201700931.
- [30] E. Mortaz, I.M. Adcock, P. Tabarsi, I.A. Darazam, M. Movassaghi, J. Garssen, H. Jamaati, A. Velayati, Pattern recognitions receptors in immunodeficiency disorders, *Eur. J. Pharmacol.* 808 (2017) 49–56. doi:10.1016/j.ejphar.2017.01.014.
- [31] K.K. Jayendra, C. Thach, E. Stephanie C., Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells, *Trends Immunol.* 34 (2014) 224–233. doi:10.1016/j.it.2012.12.003.
- [32] M. Swiecki, M. Colonna, The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 471–485. doi:10.1038/nri3865.
- [33] L. Liu, I. Botos, Y. Wang, J.N. Leonard, J. Shiloach, D.M. Segal, D.R. Davies, Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA, *Science* (80-.). 320 (2008) 379–381. doi:10.1126/science.1155406.
- [34] G. Hartmann, *Nucleic Acid Immunity*, 1st ed., Elsevier Inc., 2017. doi:10.1016/bs.ai.2016.11.001.
- [35] A.M. Krieg, AIMing 2 defend against intracellular pathogens, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 367–369. doi:10.1038/ni0510-367.
- [36] S. Reikine, J.B. Nguyen, Y. Modis, Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5, *Front. Immunol.* 5 (2014) 1–7. doi:10.3389/fimmu.2014.00342.
- [37] M. Yoneyama, M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira,

- S. Akira, T. Fujita, The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 730–737. doi:10.1038/ni1087.
- [38] S. Patel, Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation, *Curr. Allergy Asthma Rep.* 18 (2018). doi:10.1007/s11882-018-0817-3.
- [39] D. Yang, Z. Han, J.J. Oppenheim, Alarmins and immunity, *Immunol. Rev.* 280 (2017) 41–56. doi:10.1111/imr.12577.
- [40] A.M. Cameron, S.J. Lawless, E.J. Pearce, Metabolism and acetylation in innate immune cell function and fate, *Semin. Immunol.* 28 (2016) 408–416. doi:10.1016/j.smim.2016.10.003.
- [41] B. Kelly, L.A.J. O’Neill, Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity, *Cell Res.* 25 (2015) 771–784. doi:10.1038/cr.2015.68.
- [42] L.A.J. O’Neill, E.J. Pearce, Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function, *J. Exp. Med.* 213 (2016) 15–23. doi:10.1084/jem.20151570.
- [43] D.G. Ryan, L.A.J. O’Neill, Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions, *FEBS Lett.* 591 (2017) 2992–3006. doi:10.1002/1873-3468.12744.
- [44] C.M. Krawczyk, T. Holowka, J. Sun, J. Blagih, E. Amiel, R.J. DeBerardinis, J.R. Cross, E. Jung, C.B. Thompson, R.G. Jones, E.J. Pearce, Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation, *Blood.* 115 (2010) 4742–4749. doi:10.1182/blood-2009-10-249540.
- [45] M. Fliesser, C.O. Morton, M. Bonin, F. Ebel, K. Hünninger, O. Kurzai, H. Einsele, J. Löffler, Hypoxia-inducible factor 1 α modulates metabolic activity and cytokine release in anti-*Aspergillus fumigatus* immune responses initiated by human dendritic cells, *Int. J. Med. Microbiol.* 305 (2015) 865–873. doi:10.1016/j.ijmm.2015.08.036.
- [46] G. Bajwa, R.J. DeBerardinis, B. Shao, B. Hall, J.D. Farrar, M.A. Gill, Cutting Edge: Critical Role of Glycolysis in Human Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Responses, *J. Immunol.* 196 (2016) 2004–2009. doi:10.4049/jimmunol.1501557.
- [47] J. Jantsch, D. Chakravorty, N. Turza, A.T. Prectel, B. Buchholz, R.G. Gerlach, M. Volke, J. Gläsner, C. Warnecke, M.S. Wiesener, K.-U. Eckardt, A. Steinkasserer, M. Hensel, C. Willam, Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Modulate Lipopolysaccharide-Induced Dendritic Cell Activation and Function, *J. Immunol.* 180 (2008) 4697–4705. doi:10.4049/jimmunol.180.7.4697.
- [48] B. Everts, E. Amiel, S.C.C. Huang, A.M. Smith, C.H. Chang, W.Y. Lam, V. Redmann, T.C.

- Freitas, J. Blagih, G.J.W. Van Der Windt, M.N. Artyomov, R.G. Jones, E.L. Pearce, E.J. Pearce, TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1- $\text{IKK}\epsilon$ supports the anabolic demands of dendritic cell activation, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 323–332. doi:10.1038/ni.2833.
- [49] K. Ryans, Y. Omosun, D.N. McKeithen, T. Simoneaux, C.C. Mills, N. Bowen, F.O. Eko, C.M. Black, J.U. Igietseme, Q. He, The immunoregulatory role of alpha enolase in dendritic cell function during Chlamydia infection, *BMC Immunol.* 18 (2017) 1–17. doi:10.1186/s12865-017-0212-1.
- [50] H. Guak, S. Al Habyan, E.H. Ma, H. Aldossary, M. Al-Masri, S.Y. Won, T. Ying, E.D. Fixman, R.G. Jones, L.M. McCaffrey, C.M. Krawczyk, Glycolytic metabolism is essential for CCR7 oligomerization and dendritic cell migration, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–12. doi:10.1038/s41467-018-04804-6.
- [51] T. Köhler, B. Reizis, R.S. Johnson, H. Weighardt, I. Förster, Influence of hypoxia-inducible factor 1α on dendritic cell differentiation and migration, *Eur. J. Immunol.* 42 (2012) 1226–1236. doi:10.1002/eji.201142053.
- [52] S.J. Lawless, N. Kedia-Mehta, J.F. Walls, R. McGarrigle, O. Convery, L. V. Sinclair, M.N. Navarro, J. Murray, D.K. Finlay, Glucose represses dendritic cell-induced T cell responses, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–14. doi:10.1038/ncomms15620.
- [53] P.M. Thwe, L. Pelgrom, R. Cooper, S. Beauchamp, J.A. Reisz, A. D'Alessandro, B. Everts, E. Amiel, Cell-Intrinsic Glycogen Metabolism Supports Early Glycolytic Reprogramming Required for Dendritic Cell Immune Responses, *Cell Metab.* 26 (2017) 558–567.e5. doi:10.1016/j.cmet.2017.08.012.
- [54] L. Perrin-Cocon, A. Aublin-Gex, O. Diaz, C. Ramière, F. Peri, P. André, V. Lotteau, Toll-like Receptor 4-Induced Glycolytic Burst in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Results from p38-Dependent Stabilization of HIF- 1α and Increased Hexokinase II Expression, *J. Immunol.* 201 (2018) 1510–1521. doi:10.4049/jimmunol.1701522.
- [55] E. Amiel, B. Everts, T.C. Freitas, I.L. King, J.D. Curtis, E.L. Pearce, E.J. Pearce, Inhibition of Mechanistic Target of Rapamycin Promotes Dendritic Cell Activation and Enhances Therapeutic Autologous Vaccination in Mice, *J. Immunol.* 189 (2012) 2151–2158. doi:10.4049/jimmunol.1103741.
- [56] S. Márquez, J.J. Fernández, E. Terán-Cabanillas, C. Herrero, S. Alonso, A. Azogil, O. Montero, T. Iwawaki, J.R. Cubillos-Ruiz, N. Fernández, M.S. Crespo, Endoplasmic reticulum stress sensor IRE 1α enhances IL-23 expression by human dendritic cells, *Front. Immunol.* 8

- (2017) 1–19. doi:10.3389/fimmu.2017.00639.
- [57] M.M.M. Kaisar, L.R. Pelgrom, A.J. van der Ham, M. Yazdanbakhsh, B. Everts, Butyrate conditions human dendritic cells to prime type 1 regulatory T cells via both histone deacetylase inhibition and G protein-coupled receptor 109A signaling, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–14. doi:10.3389/fimmu.2017.01429.
 - [58] G. Lenaz, The mitochondrial production of reactive oxygen species: Mechanisms and implications in human pathology, *IUBMB Life.* 52 (2001) 159–164. doi:10.1080/15216540152845957.
 - [59] C. Migdal, M. Serres, Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant, *Medecine/Sciences.* 27 (2011) 405–412. doi:10.1051/medsci/2011274017.
 - [60] Z. Agod, T. Fekete, M.M. Budai, A. Varga, A. Szabo, H. Moon, I. Boldogh, T. Biro, A. Lanyi, A. Bacsı, K. Pazmandi, Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells, *Redox Biol.* 13 (2017) 633–645. doi:10.1016/j.redox.2017.07.016.
 - [61] M.A. Riedl, A.E. Nel, Importance of oxidative stress in the pathogenesis and treatment of asthma, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 8 (2008) 49–56. doi:10.1097/ACI.0b013e3282f3d913.
 - [62] V.J. Thannickal, B.L. Fanburg, Reactive oxygen species in cell signaling, *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 (2000). doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.11005.
 - [63] N. Thorin-Trescases, G. Voghel, N. Farhat, A. Drouin, M.-È. Gendron, É. Thorin, Âge Et Stress Oxydant, *Médecine/Sciences.* 26 (2010) 875–880. doi:10.1051/medsci/20102610875.
 - [64] A. Bacsı, L. Aguilera-Aguirre, B. Szczesny, Z. Radak, T.K. Hazra, S. Sur, X. Ba, I. Boldogh, Down-regulation of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 expression in the airway epithelium ameliorates allergic lung inflammation, *DNA Repair (Amst).* 12 (2013) 18–26. doi:10.1016/J.DNAREP.2012.10.002.
 - [65] A.R. Poetsch, The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 18 (2020) 207–219. doi:10.1016/j.csbj.2019.12.013.
 - [66] Y.M. Shih, M.S. Cooke, C.H. Pan, M.R. Chao, C.W. Hu, Clinical relevance of guanine-derived urinary biomarkers of oxidative stress, determined by LC-MS/MS, *Redox Biol.* 20 (2019) 556–565. doi:10.1016/j.redox.2018.11.016.
 - [67] S.W. Chan, P.C. Dedon, The biological and metabolic fates of endogenous DNA damage

- products, *J. Nucleic Acids*. 2010 (2010). doi:10.4061/2010/929047.
- [68] S.M. Harman, L. Liang, P.D. Tsitouras, F. Gucciardo, C.B. Heward, P.D. Reaven, W. Ping, A. Ahmed, R.G. Cutler, Urinary excretion of three nucleic acid oxidation adducts and isoprostane F2 α measured by liquid chromatography-mass spectrometry in smokers, ex-smokers, and nonsmokers, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 1301–1309. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.07.003.
- [69] B. Karahalil, B.A. Hogue, N.C. De Souza-Pinto, V.A. Bohr, Base excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations, *FASEB J.* 16 (2002) 1895–1902. doi:10.1096/fj.02-0463com.
- [70] N. Kumar, N.C. Moreno, B.C. Feltes, C.F.M. Menck, B. Van Houten, Cooperation and interplay between base and nucleotide excision repair pathways: From DNA lesions to proteins, *Genet. Mol. Biol.* 43 (2020) 1–14. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2019-0104.
- [71] Z. Radak, Z. Bori, E. Koltai, I.G. Fatouros, A.Z. Jamurtas, I.I. Douroudos, G. Terzis, M.G. Nikolaidis, A. Chatzinikolaou, A. Sovatzidis, S. Kumagai, H. Naito, I. Boldogh, Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 417–423. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.04.018.
- [72] T. Arai, V.P. Kelly, O. Minowa, T. Noda, S. Nishimura, The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA, *Toxicology*. 221 (2006) 179–186. doi:10.1016/J.TOX.2006.01.004.
- [73] J.G. Mabley, P. Pacher, A. Deb, R. Wallace, R.H. Elder, C. Szabó, Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation, *FASEB J.* 19 (2005) 290–292. doi:10.1096/fj.04-2278fje.
- [74] I. Boldogh, G. Hajas, L. Aguilera-Aguirre, M.L. Hegde, Z. Radak, A. Bacsí, S. Sur, T.K. Hazra, S. Mitra, Activation of Ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 20769–20773. doi:10.1074/jbc.C112.364620.
- [75] L. Aguilera-Aguirre, A. Bacsí, Z. Radak, T.K. Hazra, S. Mitra, S. Sur, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, Innate Inflammation Induced by the 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1–KRAS–NF- κ B Pathway, *J. Immunol.* 193 (2014) 4643–4653. doi:10.4049/jimmunol.1401625.
- [76] G. Hajas, A. Bacsí, L. Aguilera-Aguirre, M.L. Hegde, K.H. Tapas, S. Sur, Z. Radak, X. Ba, I.

- Boldogh, 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1, *Free Radic. Biol. Med.* (2013). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.011.
- [77] J. Luo, K. Hosoki, A. Bacsı, Z. Radak, M.L. Hegde, S. Sur, T.K. Hazra, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and α -smooth muscle actin polymerization, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 430–438. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.030.
- [78] P. German, P. Szaniszló, G. Hajas, Z. Radak, A. Bacsı, T.K. Hazra, M.L. Hegde, X. Ba, I. Boldogh, Activation of cellular signaling by 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-initiated DNA base excision repair, *DNA Repair (Amst)*. 12 (2013) 856–863. doi:10.1016/j.dnarep.2013.06.006.
- [79] X. Ba, L. Aguilera-Aguirre, S. Sur, I. Boldogh, 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA base excision repair: Role in asthma pathogenesis, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 15 (2015) 89–97. doi:10.1097/ACI.0000000000000135.
- [80] L. Pan, W. Hao, X. Zheng, X. Zeng, A. Ahmed Abbasi, I. Boldogh, X. Ba, OGG1-DNA interactions facilitate NF- κ B binding to DNA targets, *Sci. Rep.* 7 (2017) 43297. <https://doi.org/10.1038/srep43297>.
- [81] L. Aguilera-Aguirre, K. Hosoki, A. Bacsı, Z. Radák, S. Sur, M.L. Hegde, B. Tian, A. Saavedra-Molina, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, Whole transcriptome analysis reveals a role for OGG1-initiated DNA repair signaling in airway remodeling, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 20–33. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.07.007.
- [82] R. Wang, W. Hao, L. Pan, I. Boldogh, X. Ba, The roles of base excision repair enzyme OGG1 in gene expression, *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (2018) 3741–3750. doi:10.1007/s00018-018-2887-8.
- [83] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method, *Methods*. 25 (2001) 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [84] L. Aguilera-Aguirre, K. Hosoki, A. Bacsı, Z. Radák, T.G. Wood, S.G. Widen, S. Sur, B.T. Ameredes, A. Saavedra-Molina, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, Whole transcriptome analysis reveals an 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA repair-dependent gene expression linked to essential biological processes, *Free Radic. Biol. Med.* 81 (2015) 107–118. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.004.

- [85] S. Mitra, T.K. Hazra, R. Roy, S. Ikeda, T. Biswas, J. Lock, I. Boldogh, T. Izumi, Complexities of DNA Base Excision Repair in Mammalian Cells, *Mol. Cells.* 7 (1997) 305–312.
- [86] A.K. Farraj, J.R. Harkema, T.R. Jan, N.E. Kaminski, Immune responses in the lung and local lymph node of A/J mice to intranasal sensitization and challenge with adjuvant-free ovalbumin, *Toxicol. Pathol.* 31 (2003) 432–447. doi:10.1080/01926230309727.
- [87] A. Ballesteros-Tato, T.D. Randall, Priming of T follicular helper cells by dendritic cells, *Immunol. Cell Biol.* 92 (2014) 22–27. doi:10.1038/icb.2013.62.
- [88] T. Kobayashi, K. Iijima, A.L. Dent, H. Kita, Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens, *J. Allergy Clin. Immunol.* 139 (2017) 300–313.e7. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.021.
- [89] P. Carmona-Sáez, N. Varela, M.J. Luque, D. Toro-Domínguez, J. Martorell-Marugan, M.E. Alarcón-Riquelme, C. Marañón, Metagene projection characterizes GEN2.2 and CAL-1 as relevant human plasmacytoid dendritic cell models, *Bioinformatics.* 33 (2017) 3691–3695. doi:10.1093/bioinformatics/btx502.
- [90] J. Di Domizio, A. Blum, M. Gallagher-Gambarelli, J.P. Molens, L. Chaperot, J. Plumas, TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN, *Blood.* 114 (2009) 1794–1802. doi:10.1182/blood-2009-04-216770.
- [91] T. Fekete, D. Bencze, A. Szabo, E. Csoma, T. Biro, A. Bacsí, K. Pazmandi, Regulatory NLRs control the RLR-mediated type I interferon and inflammatory responses in human dendritic cells, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–19. doi:10.3389/fimmu.2018.02314.
- [92] R. Steinman, Linking innate to adaptive immunity through dendritic cells, *Novartis Found Symp.* 279 (2006) 101–109 discussion 109–13, 216–9.
- [93] L. Schaefer, Complexity of danger: The diverse nature of damage-associated molecular patterns, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 35237–35245. doi:10.1074/jbc.R114.619304.
- [94] A. Csillag, I. Boldogh, K. Pazmandi, Z. Magyarics, P. Gogolak, S. Sur, E. Rajnavolgyi, A. Bacsí, Pollen-Induced Oxidative Stress Influences Both Innate and Adaptive Immune Responses via Altering Dendritic Cell Functions, *J. Immunol.* 184 (2010) 2377–2385. doi:10.4049/jimmunol.0803938.
- [95] K. Pazmandi, B. V. Kumar, K. Szabo, I. Boldogh, A. Szoor, G. Vereb, A. Veres, A. Lanyi, E. Rajnavolgyi, A. Bacsí, Ragweed Subpollen Particles of Respirable Size Activate Human

- Dendritic Cells, *PLoS One*. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0052085.
- [96] X. Ba, L. Aguilera-Aguirre, Q.T.A.N. Rashid, A. Bacsi, Z. Radak, S. Sur, K. Hosoki, M.L. Hegde, I. Boldogh, The role of 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 in inflammation, *Int. J. Mol. Sci.* 15 (2014) 16975–16997. doi:10.3390/ijms150916975.
 - [97] K. Pazmandi, Z. Agod, B. V. Kumar, A. Szabo, T. Fekete, V. Sogor, A. Veres, I. Boldogh, E. Rajnavolgyi, A. Lanyi, A. Bacsi, Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells, *Free Radic. Biol. Med.* (2014). doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.028.
 - [98] W. Lancelin, A. Guerrero-Plata, Isolation of mouse lung dendritic cells, *J. Vis. Exp.* (2011) 6–9. doi:10.3791/3563.
 - [99] S. He, L. Wang, Y. Wu, D. Li, Y. Zhang, CCL3 and CCL20-recruited dendritic cells modified by melanoma antigen gene-1 induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo and in vivo, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29 (2010) 1–8. doi:10.1186/1756-9966-29-37.
 - [100] L. Yan, K. de Leur, R.W. Hendriks, L.J.W. van der Laan, Y. Shi, L. Wang, C.C. Baan, T follicular helper cells as a new target for immunosuppressive therapies, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–11. doi:10.3389/fimmu.2017.01510.
 - [101] G. V. Guibas, M. Makris, E. Spandou, K.N. Priftis, Exposure of immunologically naive laboratory rodents to antigen via the airways. Where does tolerance stop and sensitization begin, *Clin. Exp. Allergy.* 42 (2012) 1552–1565. doi:10.1111/j.1365-2222.2012.03974.x.
 - [102] S.C. Eisenbarth, D.A. Piggott, J.W. Huleatt, I. Visintin, C.A. Herrick, K. Bottomly, Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 1645–1651. doi:10.1084/jem.20021340.
 - [103] I. Torii, S. Shimizu, T. Daimon, Y. Shinohara, T. Kudo, A. Sato, T. Tsujimura, Exposure to high doses of lipopolysaccharide during ovalbumin sensitization prevents the development of allergic Th2 responses to a dietary antigen, *J. Toxicol. Pathol.* 27 (2014) 205–215. doi:10.1293/tox.27.2014-0023.
 - [104] R. Goenka, L.G. Barnett, J.S. Silver, P.J. O'Neill, C.A. Hunter, M.P. Cancro, T.M. Laufer, Cutting Edge: Dendritic Cell-Restricted Antigen Presentation Initiates the Follicular Helper T Cell Program but Cannot Complete Ultimate Effector Differentiation, *J. Immunol.* 187 (2011) 1091–1095. doi:10.4049/jimmunol.1100853.
 - [105] L. Risom, M. Dybdahl, P. Møller, H. Wallin, T. Haug, U. Vogel, A. Klungland, S. Loft,

- Repeated inhalations of diesel exhaust particles and oxidatively damaged DNA in young oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficient mice, *Free Radic. Res.* 41 (2007) 172–181. doi:10.1080/10715760601024122.
- [106] H. Tokiwa, N. Sera, Y. Nakanishi, M. Sagai, 8-Hydroxyguanosine formed in human lung tissues and the association with diesel exhaust particles, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 1251–1258. doi:10.1016/S0891-5849(99)00156-2.
- [107] D. Diaz-Sanchez, M.P. Garcia, M. Wang, M. Jyräla, A. Saxon, Nasal challenge with diesel exhaust particles can induce sensitization to a neoallergen in the human mucosa, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 1183–1188. doi:10.1016/S0091-6749(99)70011-4.
- [108] M.J. Whitekus, N. Li, M. Zhang, M. Wang, M.A. Horwitz, S.K. Nelson, L.D. Horwitz, N. Brechun, D. Diaz-Sanchez, A.E. Nel, Thiol Antioxidants Inhibit the Adjuvant Effects of Aerosolized Diesel Exhaust Particles in a Murine Model for Ovalbumin Sensitization, *J. Immunol.* 168 (2002) 2560–2567. doi:10.4049/jimmunol.168.5.2560.
- [109] D. Heber, Z. Li, M. Garcia-Lloret, A.M. Wong, T.Y. Lee, G. Thames, M. Krak, Y. Zhang, A. Nel, Sulforaphane-rich broccoli sprout extract attenuates nasal allergic response to diesel exhaust particles, *Food Funct.* 5 (2014) 35–41. doi:10.1039/c3fo60277j.
- [110] S. Burns, A.J. Thrasher, M.P. Blundell, L. Machesky, G.E. Jones, Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation, *Blood.* 98 (2001) 1142–1149. doi:10.1182/blood.V98.4.1142.
- [111] A.M. Giammarioli, L. Gambardella, M.G. Quaranta, C. Lapenta, S.M. Santini, F. Belardelli, M. Viora, W. Malorni, Differentiation of monocyte-derived dendritic cells is associated with upregulation and activation of Rac-1 small GTPase, *FEBS Lett.* 580 (2006) 3335–3339. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.095.
- [112] G. V. Shurin, I.L. Tourkova, G.S. Chatta, G. Schmidt, S. Wei, J.Y. Djeu, M.R. Shurin, Small Rho GTPases Regulate Antigen Presentation in Dendritic Cells, *J. Immunol.* 174 (2005) 3394–3400. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3394.
- [113] G. Singh, D. Hashimoto, X. Yan, J. Helft, P.J.Y. Park, G. Ma, R.F. Qiao, C.R. Kennedy, S.H. Chen, M. Merad, A.M. Chan, R-Ras is required for murine dendritic cell maturation and CD4 + T-cell priming, *Blood.* 119 (2012) 1693–1701. doi:10.1182/blood-2011-05-357319.
- [114] G. Pérez-Montesinos, O. López-Ortega, J. Piedra-Reyes, L.C. Bonifaz, J. Moreno, Dynamic changes in the intracellular association of selected rab small GTPases with MHC class II and DM during dendritic cell maturation, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–15.

doi:10.3389/fimmu.2017.00340.

- [115] S.H. Kim, A. Visser, C. Cruijisen, A.W.M. van der Velden, M. Boes, Recruitment of Rab27a to Phagosomes Controls Microbial Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells, *Infect. Immun.* 76 (2008) 5373 LP – 5380. doi:10.1128/IAI.01044-08.
- [116] A. Savina, A. Peres, I. Cebrian, N. Carmo, C. Moita, N. Hacohen, L.F. Moita, S. Amigorena, The Small GTPase Rac2 Controls Phagosomal Alkalinization and Antigen Crosspresentation Selectively in CD8⁺ Dendritic Cells, *Immunity*. 30 (2009) 544–555. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.013.
- [117] L. Zou, J. Zhou, J. Zhang, J. Li, N. Liu, L. Chai, N. Li, T. Liu, L. Li, Z. Xie, H. Liu, Y. Wan, Y. Wu, The GTPase Rab3b/3c- Positive recycling vesicles are involved in Cross- Presentation in dendritic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 15801–15806. doi:10.1073/pnas.0905684106.
- [118] F. Benvenuti, S. Hugues, M. Walmsley, S. Ruf, L. Fetler, M. Popoff, V.L.J. Tybulewicz, S. Amigorena, Requirement of Rac1 and Rac2 Expression by Mature Dendritic Cells for T Cell Priming, *Science* (80-.). 305 (2004) 1150 LP – 1153. doi:10.1126/science.1099159.
- [119] L. Tong, V. Tergaonkar, Rho protein GTPases and their interactions with NFκB: crossroads of inflammation and matrix biology, *Biosci. Rep.* 34 (2014). doi:10.1042/BSR20140021.
- [120] R. Perona, S. Montaner, L. Saniger, I. Sánchez-Pérez, R. Bravo, J.C. Lacal, Activation of the nuclear factor-κB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins, *Genes Dev.* 11 (1997) 463–475. doi:10.1101/gad.11.4.463.
- [121] S. Montaner, R. Perona, L. Saniger, J.C. Lacal, Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor κB by the Rho family of GTPases, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 12779–12785. doi:10.1074/jbc.273.21.12779.
- [122] C. Murga, M. Zohar, H. Teramoto, J.S. Gutkind, Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-κB, *Oncogene*. 21 (2002) 207–216. doi:10.1038/sj.onc.1205036.
- [123] L. Pan, B. Zhu, W. Hao, X. Zeng, S.A. Vlahopoulos, T.K. Hazra, M.L. Hegde, Z. Radak, A. Bacsi, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, Oxidized guanine base lesions function in 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated epigenetic regulation of nuclear factor κB-driven gene expression, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 25553–25566. doi:10.1074/jbc.M116.751453.
- [124] W. Hao, T. Qi, L. Pan, R. Wang, B. Zhu, L. Aguilera-Aguirre, Z. Radak, T.K. Hazra, S.A.

- Vlahopoulos, A. Bacsi, A.R. Brasier, X. Ba, I. Boldogh, Effects of the stimuli-dependent enrichment of 8-oxoguanine DNA glycosylase1 on chromatinized DNA, *Redox Biol.* 18 (2018) 43–53. doi:10.1016/J.REDOX.2018.06.002.
- [125] G. Hajas, A. Bacsi, L. Aguilerra-Aguirre, P. German, Z. Radak, S. Sur, T.K. Hazra, I. Boldogh, Biochemical identification of a hydroperoxide derivative of the free 8-oxo-7,8-dihydroguanine base, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 749–756. doi:10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.11.015.
- [126] Y. Tahara, D. Auld, D. Ji, A.A. Beharry, A.M. Kietrys, D.L. Wilson, M. Jimenez, D. King, Z. Nguyen, E.T. Kool, Potent and Selective Inhibitors of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 2105–2114. doi:10.1021/jacs.7b09316.
- [127] S.-Y. Chen, L. Wan, C.-M. Huang, Y.-C. Huang, J.J.-C. Sheu, Y.-J. Lin, S.-P. Liu, Y.-C. Lan, C.-H. Lai, C.-W. Lin, C.-H. Tsai, F.-J. Tsai, Association of the C-285T and A5954G polymorphisms in the DNA repair gene OGG1 with the susceptibility of rheumatoid arthritis, *Rheumatol. Int.* 32 (2012) 1165–1169. doi:10.1007/s00296-010-1738-1.
- [128] N. Shang, M. Figini, J. Shangguan, B. Wang, C. Sun, L. Pan, Q. Ma, Z. Zhang, Dendritic cells based immunotherapy, *Am. J. Cancer Res.* 7 (2017) 2091–2102. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119057>.
- [129] B. Everts, E.J. Pearce, Metabolic control of dendritic cell activation and function: Recent advances and clinical implications, *Front. Immunol.* 5 (2014) 1–7. doi:10.3389/fimmu.2014.00203.
- [130] F. Malinarich, K. Duan, R.A. Hamid, A. Bijin, W.X. Lin, M. Poidinger, A.-M. Fairhurst, J.E. Connolly, High Mitochondrial Respiration and Glycolytic Capacity Represent a Metabolic Phenotype of Human Tolerogenic Dendritic Cells, *J. Immunol.* 194 (2015) 5174–5186. doi:10.4049/jimmunol.1303316.
- [131] D. Wu, D.E. Sanin, B. Everts, Q. Chen, J. Qiu, M.D. Buck, A. Patterson, A.M. Smith, C.H. Chang, Z. Liu, M.N. Artyomov, E.L. Pearce, M. Cella, E.J. Pearce, Type 1 Interferons Induce Changes in Core Metabolism that Are Critical for Immune Function, *Immunity.* 44 (2016) 1325–1336. doi:10.1016/j.immuni.2016.06.006.
- [132] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, I. Killing-Off of Tumor Cells in Vitro ., *J. Gen. Physiol.* 8 (1927) 519–530.
- [133] S. Kouidhi, A.B. Elgaaied, S. Chouaib, Impact of metabolism on T-cell differentiation and function and cross talk with tumor microenvironment, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–13.

doi:10.3389/fimmu.2017.00270.

- [134] B. Everts, E. Amiel, G.J.W. van der Windt, T.C. Freitas, R. Chott, K.E. Yarasheski, E.L. Pearce, E.J. Pearce, Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells, *Blood*. 120 (2012) 1422–31. doi:10.1182/blood-2012-03-419747.
- [135] T. Yoshizumi, H. Imamura, T. Taku, T. Kuroki, A. Kawaguchi, K. Ishikawa, K. Nakada, T. Koshiba, RLR-mediated antiviral innate immunity requires oxidative phosphorylation activity, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–12. doi:10.1038/s41598-017-05808-w.
- [136] N. Garzorz-Stark, F. Lauffer, L. Krause, J. Thomas, A. Atenhan, R. Franz, S. Roenneberg, A. Boehner, M. Jargosch, R. Batra, N.S. Mueller, S. Haak, C. Groß, O. Groß, C. Traidl-Hoffmann, F.J. Theis, C.B. Schmidt-Weber, T. Biedermann, S. Eyerich, K. Eyerich, Toll-like receptor 7/8 agonists stimulate plasmacytoid dendritic cells to initiate TH17-deviated acute contact dermatitis in human subjects, *J. Allergy Clin. Immunol.* 141 (2018) 1320-1333.e11. doi:10.1016/j.jaci.2017.07.045.
- [137] A. Pantel, A. Teixeira, E. Haddad, E.G. Wood, R.M. Steinman, M.P. Longhi, Direct Type I IFN but Not MDA5/TLR3 Activation of Dendritic Cells Is Required for Maturation and Metabolic Shift to Glycolysis after Poly IC Stimulation, *PLoS Biol.* 12 (2014). doi:10.1371/journal.pbio.1001759.



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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.02.02.





Registry number: DEENK/41/2021.PL
Subject: PhD Publication List

Candidate: Máté István Sütő

Doctoral School: Doctoral School of Molecular Cellular and Immune Biology

MTMT ID: 10056732

List of publications related to the dissertation

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>
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

Total IF of journals (all publications): 10,886

Total IF of journals (publications related to the dissertation): 10,886

The Candidate's publication data submitted to the iDEa Tudóstér have been validated by DEENK on the basis of the Journal Citation Report (Impact Factor) database.

02 February, 2021



X. 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

Keywords

innate immunity, dendritic cell activation, oxidative stress, 7, 8-dihydro-8-oxoguanine, 8-oxoguanine DNA glycosilase 1, DNA base excision repair, metabolic reprogramming, RIG-I, type-I interferone, antiviral response

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 Adrienn-nek, 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.

Konferencia részvételek

Előadások:

Oxidized products generated by 8-oxoguanine DNA glycosylase 1-dependent base excision repair processes contribute to dendritic cell activation,
12th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2019

Immunomodulatory effects of radiation detoxifies endotoxin,
11th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2018

An oxidized guanine base (7,8-dihydro-8-oxoguanine) could serve as an alarm signal for dendritic cells
10th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2017

HOFI knock out és vad típusú egércsontvelői eredetű makrofágok IFN-gamma válaszainak vizsgálata
2014/2015. tanévi Orvos- és Egészségtudományi Tudományos Diákköri Konferencia, Debrecen, 2015

Poszterek:

Sütő, M.I.; Agod, Zs.; Bácsi, A.; Lányi, Á.: Responses of bone marrow-derived macrophages from HOFI knockout and wild-type mice to INF-gamma,
8th Molecular, Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015

I. Kiegészítő táblázatok

Genes associated with cytokines, chemokines and their receptors

Gene Symbol	(First) Author	Year of publication	Journal	DOI
Ccl2	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Ccl3	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Ccl4	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Ccl5	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Ccl7	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Ccl8	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Ccl11	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccl12	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Ccl17	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccl19	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccl20	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccr1	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccr2	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccr3	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Ccr5	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Le Naour F	2001	J Biol Chem	10.1074/jbc.M100156200
Ccr12	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
Cxcl1	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2

Genes associated with antigen uptake

Gene Symbol	(First) Author	Year of publication	Journal	DOI or PMID
Cxcl2	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Cxcl9	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Cxcl10	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Cxcl12	Pease JE	2011	Biochem J	10.1042/BJ20101132
Cxcr1	Sozzani S	1997	J Immunol	PMID: 9257866
Cxcr4	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
	Hieronymus T	2005	J Immunol	10.4049/jimmunol.174.5.2552
ErbB2	Meyers JL	2018	PLoS One	10.1371/journal.pone.0207007
Ifng	Mabbott NA	2010	Immunobiology	10.1016/j.imbio.2010.05.012
Ifngr1	Lee SH	2013	J Immunol	10.4049/jimmunol.1300910
Il1a	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
Il1b	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
	Zasłona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Il2	Garnucci	2001	Nat Immunol	PMID: 11526406
Il6	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Il12a	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
Il12b	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Il16	Schnuch A	2010	Contact Dermatitis	10.1111/j.1600-0536.2010.01800.x
Lyn	Li R	2016	Signal Transduct Target Ther	10.1038/sigtrans.2016.32
Mdk	Haffner-Luntzer M	2017	Eur J Med Res	10.1186/s40001-017-0264-y
	Zhou G	2016	PLoS Negl Trop Dis	10.1371/journal.pntd.0004624
Mif	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
Tnf	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
Tnfsf9	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
Tnfsf11	Costa V	2017	Int J Mol Sci	10.3390/ijms18030494
Trap1	Asea A	2005	Exerc Immunol Rev	PMID: 16385842

Genes associated with antigen uptake

Gene Symbol	(First) Author	Year of publication	Journal	DOI
Cd44	Ardavin C	1993	Immunol Lett	10.1016/0165-2478(93)90113-G
Cdc42	Huber C	2008	J Biol Chem	10.1074/jbc.M803957200
Icam1	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Schmidt SV	2012	Front Immunol	10.3389/fimmu.2012.00274
	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Icam2	Schmidt SV	2012	Front Immunol	10.3389/fimmu.2012.00274
Rac1	Huber C	2008	J Biol Chem	10.1074/jbc.M803957200
Stk4	Wilkinson DS	2015	Mol Cell	10.1016/j.molcel.2014.11.019.

Genes associated with antigen presentation

Gene Symbol	(First) Author	Year of publication	Journal	DOI
Adamdec1	O'Shea NR	2016	J Crohns Colitis	10.1093/ecco-jcc/jjw111
B2m	Aricò E	2005	J Transl Med	10.1186/1479-5876-3-45
Cd1d1	Hieronimus T	2005	J Immunol	10.4049/jimmunol.174.5.2552
Cd1d2	Qian G	2010	Cell Res	10.1038/cr.2010.6.
Cd4	Mabbott NA	2010	Immunobiology	10.1016/j.imbio.2010.05.012
Cd8a	Zhou G	2016	PLoS Negl Trop Dis	10.1371/journal.pntd.0004624
Cd28	Orabona C	2004	Nat Immunol	10.1038/ni1124
Cd40	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Cd40lg	Johnson S	2009	Immunity	10.1016/j.immuni.2008.11.015
Cd74	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
Cd80	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Cd83	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Cd86	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Cd209a	Mabbott NA	2010	Immunobiology	10.1016/j.imbio.2010.05.012
Erap1	Schmidt K	2018	Cancer Res	10.1158/0008-5472.CAN-17-1946
H2-aa	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Zhou G	2016	PLoS Negl Trop Dis	10.1371/journal.pntd.0004624
H2-Dma	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Tap1	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Tapbp	Xiao X	2017	Bone Joint Res	10.1302/2046-3758.57.2000502

Genes associated with cell surface receptors

Gene Symbol	(First) Author	Year of publication	Journal	DOI
Cd2	Zhou G	2016	PLos Negl Trop Dis	10.1371/journal.pntd.0004624
Cd33	Zhou G	2016	PLos Negl Trop Dis	10.1371/journal.pntd.0004624
Cd36	Corcoran L	2002	Int Immunol	10.1093/intimm/adx075
Fcamr	Yoshizawa Y	2013	Mol Immunol	10.1016/j.molimm.2013.10.002
Fcer1a	Shin JS	2015	Cell Mol Life Sci	10.1007/s00018-015-1870-x
Fcer1g	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
	Le Naour F	2001	J Biol Chem	10.1074/jbc.M100156200
Fcer2a	Mabbott NA	2010	Immunobiology	10.1016/j.imbio.2010.05.012
Fcgrt	Baker K	2013	Immunity	10.1016/j.immuni.2013.11.003
Fcgr1	Zhou G	2016	PLos Negl Trop Dis	10.1371/journal.pntd.0004624
	Sun X	2013	PLoS One	10.1371/journal.pone.0055984
Lrp1	Mishra A	2017	J Allergy Clin Immunol	10.1016/j.jaci.2017.10.044
	Hieronimus T	2005	J Immunol	10.4049/jimmunol.174.5.2552
Tlr1	Edwards AD	2003	Eur J Immunol	10.1002/eji.200323797
Tlr2	Edwards AD	2003	Eur J Immunol	10.1002/eji.200323797
Tlr4	Edwards AD	2003	Eur J Immunol	10.1002/eji.200323797
Tlr5	Edwards AD	2003	Eur J Immunol	10.1002/eji.200323797
Tlr6	Edwards AD	2003	Eur J Immunol	10.1002/eji.200323797
Tnfrsf9	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380

Genes associated with signal transduction

Gene Symbol	(First) Author	Year of publication	Journal	DOI
Cdkn1a	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
	Fainaru O	2007	Genes Immun	10.1038/sj.gene.6364380
Cebpa	Mabbott NA	2010	Immunobiology	10.1016/j.imbio.2010.05.012
Csf1r	Hey Y	2016	PLoS One	10.1371/journal.pone.0162358
Fas	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
Ifit3	Jin P	2010	J Transl Med	10.1186/1479-5876-8-4
Itgam	Zastona Z	2009	Respir Res	10.1186/1465-9921-10-2
Itgb2	Hieronimus T	2005	J Immunol	10.4049/jimmunol.174.5.2552
Nfkb1	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Nfkb2	Jie Z	2018	Nat Immunol	10.1038/s41590-018-0206-z
Nfkbiz	Connor LM	2017	J Exp Med	10.1084/jem.20160470
	Torri A	2010	PLoS One	10.1371/journal.pone.0009404
Pdia3	Guermonprez P	2003	Nature	10.1038/nature01911
Rela	Aricò E	2005	J Transl Med	10.1186/1479-5876-3-45
Relb	Bertin-Maghit S	2011	Diabetes	10.2337/db10-0104
Vcl	Wernimont SA	2008	Eur J Cell Biol	10.1016/j.ejcb.2008.01.011

II. Kiegészítő táblázatok

Genes associated with cytokines, chemokines and their receptors

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_011333	Ccl2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	4,73	-1,06	-1,20	1,85	1,69	-2,01
NM_011337	Ccl3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	32,43	27,26	25,37	11,29	9,19	7,36
NM_013652	Ccl4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	6,32	5,17	7,58	1,56	1,97	2,49
NM_013653	Ccl5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	1,46	1,20	1,02	-1,21	1,28	1,45
NM_013654	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	4,61	-2,04	-1,79	1,30	-1,06	-3,61
NM_021443	Ccl8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-1,05	-1,54	-1,69	-2,12	1,89	-1,72
NM_011330	Ccl11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	-1,41	-1,71	-1,62	1,16	2,93	1,23
NM_011331	Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12	3,76	1,10	-1,98	1,39	1,15	-1,84
NM_011332	Ccl17	Chemokine (C-C motif) ligand 17	1,33	2,16	1,67	-4,08	-2,89	-1,99
NM_011888	Ccl19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	-1,43	-1,13	-1,02	-2,09	1,91	1,43
NM_016960	Ccl20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	2,06	58,88	54,51	2,49	7,64	43,10
NM_009912	Ccr1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	1,67	1,46	1,31	2,24	1,66	2,44

NM_009915	Ccr2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	1,57	1,13	-1,75	1,36	1,12	-1,71
NM_009914	Ccr3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	1,22	1,09	-2,01	1,56	1,16	-1,48
NM_009917	Ccr5	Chemokine (C-C motif) receptor 5	1,02	-1,47	-2,09	2,54	2,85	1,08
NM_00130237 6	Ccr12	Chemokine (C-C motif) receptor like 2	1,15	1,78	1,93	1,56	1,93	2,18
NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	10,19	54,45	111,90	5,25	15,94	48,82

Genes associated with cytokines, chemokines and their receptors

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_009140	Cxcl2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	117,91	192,95	221,99	42,61	48,55	73,33
NM_008599	Cxcl9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-1,62	-1,51	-1,68	2,43	9,09	2,87
NM_021274	Cxcl10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1,14	1,48	1,55	4,10	13,57	3,93
NM_021704	Cxcl12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-1,18	-1,18	-1,29	3,19	3,44	2,06
NM_178241	Cxcr1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1	1,13	1,05	1,25	1,16	1,57	1,62
NM_009911	Cxcr4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1,29	1,13	-1,13	1,26	-1,02	-1,36
NM_001003817	ErbB2	V-erb-b2 eErythroblastic leukemia viral	-1,09	-1,15	-1,16	1,07	1,04	-1,09

oncogene
homolog 2

NM_008337	lfng	Interferon gamma	2,04	1,91	1,61	-1,01	1,09	-1,10
NM_010511	lfngr1	Interferon gamma receptor 1	1,06	1,47	1,54	1,59	1,88	1,91
NM_010554	Il1a	Interleukin 1- alpha	2,09	4,17	5,11	3,48	5,55	5,10
NM_008361	Il1b	Interleukin 1b	3,59	4,15	3,95	2,31	2,52	2,86
NM_008366	Il2	Interleukin 2	1,03	-2,57	-2,16	-1,22	-3,82	-1,36
NM_001314054	Il6	Interleukin 6	5,72	10,44	21,56	3,54	2,75	8,17
NM_008351	Il12a	Interleukin 12a	1,35	-1,09	-1,38	1,28	-1,34	-1,19
NM_001303244	Il12b	Interleukin 12b	1,50	2,28	2,08	7,00	16,42	7,06
NM_010551	Il16	Interleukin 16	1,10	-1,23	-1,53	1,38	1,51	-1,05
NM_010747	Lyn	Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog	1,07	1,13	1,16	1,83	1,89	1,55

Genes associated with cytokines, chemokines and their receptors

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_010784	Mdk	Midkine	1,60	1,30	1,36	-1,62	-2,26	-1,80
NM_010798	Mif	Macrophage migration inhibitory factor	1,12	-1,21	-1,15	-1,38	-1,46	-1,54
NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	22,15	16,65	19,42	8,90	7,13	8,63
NM_009404	Tnfsf9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 9	-1,36	-1,22	1,63	-1,05	1,71	2,00
NM_011613	Tnfsf11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	-2,16	-1,38	-1,87	3,09	5,22	3,11
NM_026508	Trap1	TNF receptor-associated protein 1	-1,19	-1,24	-1,36	1,43	1,41	1,25

Genes associated with antigen uptake

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_009851	Cd44	CD44 antigen	1,05	1,24	1,46	1,31	1,50	1,34
NM_009861	Cdc42	Cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae)	1,04	1,05	-1,05	1,09	1,10	-1,06
NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	1,05	1,30	1,82	1,54	2,12	2,41
NM_010494	Icam2	Intercellular adhesion molecule 2	1,15	1,13	-1,04	-1,38	-1,31	-1,92
NM_009007	Rac1	RAS-related C3 botulinum substrate 1	-1,01	1,06	1,01	1,14	1,24	-1,00
NM_021420	Stk4	Serine/threonine kinase 4	1,19	1,17	1,03	1,55	1,67	1,12

Genes associated with antigen presentation

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_021475	Adamde c1	ADAM-like, decysin 1	1,21	2,63	2,08	-1,20	-1,60	1,28
NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin	-1,05	-1,07	-1,08	1,06	1,39	-1,04
NM_007639	Cd1d1	CD1d1 antigen	-1,07	-1,20	-1,37	1,53	1,19	1,42
NM_007640	Cd1d2	CD1d2 antigen	1,27	1,29	1,19	2,32	1,79	2,11
NM_013488	Cd4	CD4 antigen	1,30	1,09	1,20	1,24	2,00	1,52
NM_001081110	Cd8a	CD8 antigen, alpha chain	1,61	1,43	1,25	1,29	2,12	1,94
NM_007642	Cd28	CD28 antigen	1,20	1,72	3,11	1,98	3,95	5,61
NM_011611	Cd40	CD40 antigen	1,61	1,48	1,24	-1,25	-1,31	-1,27
NM_011616	Cd40lg	CD40 ligand	1,14	-1,13	1,01	3,89	4,56	3,46
NM_010545	Cd74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	1,30	1,20	1,14	-1,20	-1,08	-1,53
NM_009855	Cd80	CD80 antigen	-1,38	1,02	1,09	1,47	1,84	1,74
NM_001289915	Cd83	CD83 antigen	1,54	2,39	2,68	1,36	2,03	2,43
NM_019388	Cd86	CD86 antigen	-1,00	1,02	1,02	1,23	1,35	1,61
NM_133238	Cd209a	CD209a antigen	-1,26	-1,24	-1,63	1,30	1,13	1,11

NM_030711	Erap1	Endoplasmic reticulum amino-peptidase 1	-1,20	-1,01	-1,01	2,46	3,07	1,71
NM_010378	H2-aa	Histocompatibility 2 class II antigen A alpha precursor	1,42	1,31	1,20	-1,37	-1,20	-1,58

Genes associated with antigen presentation

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_010386	H2-DMa	Histocompatibility 2, class II, locus DMa	1,38	1,28	1,15	-1,21	-1,14	-1,27
NM_001161730	Tap1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	1,40	1,28	1,27	1,56	2,20	1,26
NM_009318	Tapbp	TAP binding protein	1,12	1,14	1,15	-1,16	-1,03	-1,39

Genes associated with cell surface receptors

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_013486	Cd2	CD2 antigen	1,63	1,32	1,28	-1,03	1,02	-1,02
NM_021293	Cd33	CD33 antigen	-1,21	1,06	1,36	2,17	2,67	2,78
NM_007643	Cd36	CD36 antigen	-1,17	1,05	-1,03	1,22	1,31	1,07
NM_144960	Fcamr	Fc receptor, IgA, IgM, high affinity	1,21	-1,01	1,17	1,80	2,27	2,96
NM_010184	Fcgr1a	Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide	1,35	1,05	-1,60	2,19	1,28	2,19
NM_010185	Fcgr1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	1,41	1,19	1,05	-1,54	-1,58	-1,61
NM_013517	Fcgr2a	Fc receptor, IgE, low affinity II, alpha polypeptide	2,00	1,16	-1,35	1,22	1,46	-1,20
NM_010189	Fcgrt	Fc receptor, IgG, alpha chain transporter	1,01	1,01	-1,13	-1,28	-1,30	-1,39
NM_010186	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	-1,18	-1,29	-2,01	1,35	1,21	-1,14
NM_008512	Lrp1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	-1,34	-1,05	1,19	-1,12	1,52	-1,04
NM_030682	Tlr1	Toll-like receptor 1	1,98	1,29	-1,02	1,77	1,65	1,60

NM_011905	Tlr2	Toll-like receptor 2	2,56	3,81	5,38	2,78	3,38	4,04
NM_021297	Tlr4	Toll-like receptor 4	-1,29	-1,28	-1,59	2,01	1,62	1,46
NM_016928	Tlr5	Toll-like receptor 5	-1,02	1,31	1,35	5,15	6,20	4,29
NM_011604	Tlr6	Toll-like receptor 6	1,34	1,06	-1,12	1,82	1,84	1,50
NM_001077508	Tnfrsf9	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9	-1,36	-1,22	1,63	-1,05	1,71	2,00

Genes associated with signal transduction

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_007669	Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	-1,53	1,09	2,21	1,88	2,94	2,91
NM_007678	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	-1,32	-1,46	-1,89	1,60	1,61	1,12
NM_001037859	Csf1r	Colony stimulating factor 1 receptor	-1,02	1,07	1,01	1,60	2,01	1,38
NM_007987	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	1,29	1,80	1,94	-1,27	-1,29	1,25
NM_010501	Ifit3	Interferon-induced protein with	1,31	1,06	-1,16	1,93	1,64	1,30

		tetratricopeptide repeats 3						
NM_008401	Itgam	Integrin alpha M	1,19	1,26	1,07	2,75	3,66	2,94
NM_008404	Itgb2	Integrin beta 2	1,16	1,19	1,01	2,32	2,53	2,01
NM_008689	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105	-1,04	1,06	1,08	2,01	2,24	1,84
NM_019408	Nfkb2	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100	1,01	1,07	1,39	-1,10	1,27	1,20
NM_001159394	Nfkbiz	NF-kappa-B inhibitor zeta	2,02	4,10	4,76	2,21	2,88	4,55
NM_007952	Pdia3	Protein disulfide isomerase associated 3	-1,09	-1,03	-1,05	1,39	1,43	1,20
NM_009045	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	1,14	1,19	1,34	-1,22	-1,06	-1,08

Genes associated with signal transduction

GENE BANK	SYMBOL	DESCRIPTION	FOLD CHANGES OF GENE EXPRESSION					
			Treatments					
			Single challenge			Multiple challenge		
			30 min	60 min	120 min	30 min	60 min	120 min
NM_009046	Relb	Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B	1,21	1,26	1,91	-1,26	-1,03	1,33
NM_009502	Vcl	Vinculin	-1,28	1,00	1,10	1,71	2,58	1,40

Függelék