

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

Citoszólikus szenzorok aktivitásának és szabályozó
mechanizmusaiknak vizsgálata plazmacitoid dendritikus sejtekben

Bencze Dóra

Témavezető: Dr. Pázmándi Kitti Linda



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2023

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	7
II. Irodalmi áttekintés	8
II.1 A DS-ek jelentősége	8
II.2 A DS-ek altípusai és eredetük	10
II.3 A vérben lévő DS altípusok specializált funkciói	13
II.4 Plazmacitoid dendritikus sejtek	16
II.4.1 A pDS-ek morfológiája	16
II.4.2 A pDS-ek eloszlása, fenotípusa és receptor mintázata	17
II.4.3 PDS-ek, mint professzionális I-es típusú IFN termelő sejtek	18
II.4.4 A pDS-ek szerepe az antibakteriális és az antifungális immunválaszokban	23
II.4.5 A pDS-ek szerepe humán kórképekben	25
II.4.6 PDS sejtmodellek	27
II.5 Citoszólikus szenzorok	27
II.6 A sokszínű NLR-ek	30
II.6.1 Regulatórikus NLR-ek	32
II.6.1.1 Túl az enhanszoszómán: NLRC5	32
II.6.1.2 NLRX1, a mitokondrium-asszociált regulatórikus NLR	34
II.6.2 Inflammaszóma formáló NLR-ek	35
II.6.2.1 Az NLRP3 inflammaszóma	36
II.7 A citoszólikus szenzorok aktivitásának szabályozása	39
II.7.1 Receptor-receptor kölcsönhatásokon alapuló szabályozás	40
II.7.1.1 Az NLRC5 szerepe az RLR-közvetített immunválasz szabályozásában	40
II.7.1.2 Az NLRX1 szerepe az RLR-közvetített immunválasz szabályozásában	41
II.7.2 Receptor aktivitást követő citokin válaszok interakcióin alapuló szabályozás	42
III. Célkitűzések	46
IV. Anyagok és módszerek	47
IV.1 Sejtvonalak és sejtenyésztési körülmények	47
IV.2 Humán perifériás vérminták gyűjtése és feldolgozása	47
IV.3 Primer sejtek izolálása és differenciáltatása	48
IV.4 Géncsendesítési kísérletek	49
IV.5 A VSV vírus szaporítása és a vírustiter meghatározása	49
IV.6 Az <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Candida albicans</i> tenyésztése és a csíraszám meghatározása	50
IV.7 A sejtek kezelése	51
IV.8 A sejtek áramlási citometriás vizsgálata	52
IV.9 Kvantitatív valós idejű polimeráz lánc reakció (PCR)	53
IV.10 Western blot analízis	54
IV.11 Enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA)	54
IV.12 Statisztikai elemzés	54
V. Eredmények	56
V.1 A regulatórikus NLR-ek szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek RLR-közvetített antivirális, illetve gyulladásos válaszában	56
V.1.1 Az NLRC5 és az NLRX1, illetve az RLR jelátviteli komponensek expressziójának vizsgálata aktiválatlan és TLR9 liganddal, CpG-A-val aktivált humán GEN2.2 pDS sejtvonalon és primer pDS-ekben	56
V.1.2 Az NLRC5 és az NLRX1 csendesítés hatásának vizsgálata az RLR jelátviteli komponensek expressziójára GEN2.2 sejtekben	60

<i>V.1.3 Az NLRC5 és az NLRX1 szerepének vizsgálata a GEN2.2 sejtek RLR-indukált I-es típusú IFN, illetve pro-inflammatórikus válaszában</i>	62
<i>V.1.4 A moDS-ek NLRC5 és NLRX1 expressziós profiljának vizsgálata.....</i>	66
<i>V.1.5 Az NLRX1 és az NLRC5 szabályozó szerepének feltárása a moDS-ek RLR-közvetített antivirális és pro-inflammatórikus válaszában</i>	70
<i>V.1.6 Az NLRC5 és az NLRX1 szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek vírusfertőzésre adott antivirális és pro-inflammatórikus válasza során.....</i>	74
V.2 Az I-es típusú IFN útvonal és az NLRP3-függő IL-1β szekréciós útvonal kölcsönhatásainak feltárása humán pDS-ekben	78
<i>V.2.1 Az NLRP3 inflammaszóma komponensek expressziójának vizsgálata aktiválatlan és aktivált humán GEN2.2 pDS sejtvonalon</i>	<i>78</i>
<i>V.2.2 A GEN2.2 humán pDS sejtvonalon érett IL-1β szekréciójához szükséges aktivációs szignálok azonosítása.....</i>	<i>81</i>
<i>V.2.3 Az NLRP3 útvonal aktivitásának vizsgálata primer humán pDS-ekben</i>	<i>85</i>
<i>V.2.4 A pDS-ek NLRP3 inflammaszóma aktivitásának vizsgálata I-es típusú IFN jelenlétében</i>	<i>90</i>
<i>V.2.5 A fokozott I-es típusú IFN termelődést kiváltó vírusok NLRP3 inflammaszóma aktivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata humán pDS-ekben.....</i>	<i>93</i>
<i>V.2.6 A pDS-ek NLRP3 inflammaszóma aktivitásának vizsgálata magas IFN szignatúrával asszociált autoimmun betegségben</i>	<i>97</i>
VI. Megbeszélés	103
VII. Új eredmények.....	114
VIII. Összefoglalás	115
IX. Irodalomjegyzék.....	117
X. Kulcsszavak.....	133
XI. Saját közlemények jegyzéke.....	134
XII. Köszönetnyilvánítás	136

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Angol megfelelő	Magyar megfelelő
25-HC	25-hydroxycholesterol	25-hidroxikoleszterol
5'ppp	5'triphosphate	5'trifoszfát
7-AAD	7-aminoactinomycin D	7-aminoaktinomycin-D
AIM2	absent in melanoma 2	melanomában hiányzó fehérje 2
ALR	AIM2-like receptor	AIM2-szerű receptor
AMA	antimycin A	antimycin A
ANOVA	analysis of variance	varianciaanalízis
APS	antigen-presenting cell	antigén prezentáló sejt
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain	apoptózis-asszociált speck-szerű, kaspáz aktivációs és toborzó domént tartalmazó fehérje
ATP	adenosine triphosphate	adenozin-trifoszfát
BRCC	BRCA1/BRCA2-containing complex subunit	BRCA1/BRCA2-t tartalmazó komplex alegység
CARD	caspase activation and recruitment domain	kaspáz aktivációs és toborzó domén
CDP	common dendritic cell progenitor	közös dendritikus sejt progenitor
cDS	conventional or classical dendritic cell	konvencionális vagy klasszikus dendritikus sejt
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase	ciklikus GMP-AMP szintáz
CH25H	cholesterol 25-hydroxylase	koleszterol 25-hidroxiláz
CIITA	class II major histocompatibility complex transactivator	II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex transzaktivátor
CLR	C-type lectin receptor	C-típusú lektin receptor
CMV	cytomegalovirus	cytomegalovírus
COP	CARD only proteins	csak CARD fehérjék
DAMP	damage-associated molecular patterns	veszély asszociált molekuláris mintázat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential médium
DS	dendritic cell	dendritikus sejt
ds	double-stranded	kétszálú
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	enzim-kapcsolt immunoszorbens assay
ET	extracellular trap	extracelluláris csapda
ER	endoplasmic reticulum	endoplazmatikus retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting	fluoreszcencia-aktivált sejt elválasztás
FBS	fetal bovine serum	fetális szarvasmarha szérum
FITC	fluorescein isothiocyanate	fluoreszcein-izotiocianát
FSC	forward scatter	előre irányuló fényszórás

GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor
GMDP	granulocyte, monocyte and DC progenitor	granulocita-monocita-DS progenitor
HIV	human immunodeficiency virus	humán immundeficiencia vírus
HSC	hematopoietic stem cell	hematopoetikus őssejt
HSV	herpes simplex virus	herpes simplex vírus
IBD	inflammatory bowel diseases	gyulladásos bélbetegségek
IFN	interferon	interferon
IFNAR	interferon- α/β receptor	interferon- α/β receptor
Ig	immunoglobulin	immunglobulin
IGS	interferon gene signature	interferon gén szignatúra
IκBα	NF- κ B inhibitor α	NF- κ B inhibitor α
IKK	I κ B kinase	I κ B-kináz
IL	interleukin	interleukin
IL-1Ra	interleukin-1 receptor antagonist	interleukin-1 receptor antagonista
ILC	innate lymphoid cell	veleszületett limfoid sejt
IMQ	Imiquimod	Imiquimod
iNOS	inducible nitric oxide synthase	indukálható nitrogén-oxid-szintáz
IRF	interferon regulatory factor	interferon regulatórikus faktor
LFA1	lymphocyte function-associated antigen 1	limfocita funkció-asszociált antigén 1
LP	lymphoid progenitor	limfoid progenitor
LPS	lipopolysaccharide	lipopoliszacharid
LRR	leucine-rich repeat	leucinban gazdag ismétlődő domén
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogén aktivált protein kináz
MAVS	mitochondrial antiviral-signaling protein	mitokondriális antivirális szignalizációs fehérje
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	makrofág kolónia stimuláló faktor
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5	melanoma differenciáció asszociált fehérje 5
MHC	major histocompatibility complex	fő hisztokompatibilitási komplex
moDS	monocyte-derived dendritic cell	monocita eredetű dendritikus sejt
MOI	multiplicity of infection	fertőzés multiplicitás
MSU	monosodium urate	mononátrium-urát
MyD88	myeloid differentiation primary response 88	mieloid differenciációs primer válasz 88
NEK7	NIMA-related kinase 7	NIMA-asszociált kináz 7
NF-κB	nuclear factor-kappaB	nukleáris faktor-kappaB

NK	natural killer cell	természetes ölősejt
NLR	NOD-like receptor	NOD-szerű receptor
NLRC5	NLR family CARD domain containing 5	NLR család CARD domént tartalmazó fehérje 5
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	NLR család pirin domént tartalmazó fehérje 3
NLRX1	nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat-containing protein X1	nukleotidkötő domént és leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó fehérje X1
NOD	nucleotide oligomerization domain	nukleotid-kötő oligomerizációs domén
NTP	nucleoside triphosphate	nukleozid-trifoszfát
ODN	oligodeoxynucleotide	oligodeoxinukleotid
PAMP	pathogen-associated molecular patterns	patogén asszociált molekuláris mintázat
PBMC	peripheral mononuclear cell	perifériás mononukleáris sejt
PCBP2	poly(rC) binding protein 2	poli(rC) kötőfehérje 2
PCR	polymerase chain reaction	polimeráz lánc reakció
pDS	plasmacytoid dendritic cell	plazmacitoid dendritikus sejt
PE	phycoerythrin	fikoeritrin
PGE2	prostaglandin E2	prostaglandin E2
polyI:C	polyinosinic:polycytidylic acid	polyinozin:polycitidilsav
POP	PYD-only proteins	csak PYD fehérjék
PRR	pattern recognition receptor	mintázat felismerő receptor
PYD	pyrin domén	pirin domén
RA	rheumatoid arthritis	rheumatoid arthritis
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	retinsav-indukálható gén I
RLR	retinoic acid-inducible gene-I-like receptor	retinsav-indukálható gén I-szerű receptor
ROS	reactive oxygen species	reaktív oxigén gyök
siRNS	small interfering RNA	kis interferáló RNS
SLE	systemic lupus erythematosus	szisztémás lupus erythematosus
SM	multiple sclerosis	sclerosis multiplex
SOCS1	suppressor of cytokine signaling 1	citokin jelátvitel szuppresszor 1
SREBP	sterol regulatory-element binding protein	szterol szabályozó elemet kötő fehérje
ss	single-stranded	egyszálú
SSC	side scatter	oldalirányú fényszórás
STAT	signal transducer and activator of transcription	transzkripció jelátalakító és aktiváló
STING	stimulator of interferon genes	interferon gén stimulátor

TBK1	TANK-binding kinase 1	TANK-kötő kináz 1
tDS	transitional dendritic cell	tranzícionális dendritikus sejt
Tfh	T follicular helper	follikuláris T helper
Th	T helper	T helper
TLR	Toll-like receptor	Toll-szerű receptor
TRAF	TNF receptor associated factor	TNF receptor asszociált faktor
VSV	vesicular stomatitis virus	vezikuláris stomatitis vírus

I. Bevezetés

Szervezetünk őrszemeinek, a dendritikus sejteknek (DS) az egyik nagyon ritka, de nélkülözhetetlen altípusát a plazmacitoid dendritikus sejtek (pDS) alkotják, melyek professzionális I-es típusú interferon (IFN) termelő sejtekként az antivirális válasz kulcsfontosságú elemei. Ugyanakkor patológiás körülmények között a pDS-ek túlzott aktivációja és az IFN-ok túltermelése krónikus szövetkárosodáshoz és autoimmun reakciók kialakulásához vezethet, így a pDS-ek számos kórkép patogenezisében szerepet játszhatnak.

A DS-ek fő immunológiai funkcióikat az általuk expresszált mintázat felismerő receptorok (PRR) aktiválásán keresztül látják el. A pDS-ekben az endoszomális Toll-szerű receptor (TLR) 7 és TLR9 domináns szerepe már régóta ismert, azonban citoplazmatikus receptoraikról jelenleg keveset tudunk. Nemrégiben kimutattuk, hogy a citoszólikus retinsav-indukálható gén I (RIG-I)-szerű receptorok (RLR) is funkcionálnak a pDS-ekben, így feltételeztük, hogy az RLR-ek mellett a nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű receptorok (NLR-ek) is működhetnek a pDS-ekben, meghatározva a pDS-közvetített immunválaszok kimenetelét. Így munkánk során átfogóan kívántuk jellemezni a regulatórikus és az inflammaszóma formáló NLR-ek funkcionalitását humán pDS-ekben. Továbbá azonosítani akartuk azon tényezőket, melyek az NLRP3 inflammaszóma kialakulásához és inflammaszóma-asszociált interleukin (IL)-1 β termeléshez vezethetnek a humán pDS-ekben.

Mivel a pDS-ek, illetve az inflammaszóma túlműködése is autoimmun betegségek kialakulását eredményezheti, az IFN, illetve az IL-1 β termelés szabályozása és finomhangolása elengedhetetlen a kontrollálatlan gyulladások elkerülése érdekében. A gyulladással járó válaszokat és a DS-ek aktivációját, valamint citokin szekrécióját számos mechanizmus, többek között receptor kölcsönhatások is szabályozhatják. Így tanulmányozni kívántuk a regulatórikus NLR-ek szabályozó szerepét a pDS-ek RLR-mediált antivirális és gyulladással járó válaszaiban, mely a citoszólikus szenzorok kölcsönhatásainak fontosságát hangsúlyozná pDS-ekben. Továbbá meg szeretnénk vizsgálni, hogy a pDS-ek esetében is fennáll-e az a szabályozó, kölcsönös negatív interakció az antivirális I-es típusú IFN és az antibakteriális NLRP3-függő IL-1 β útvonalak között, melyet egyéb természetes immunsejtek esetében már korábban megfigyeltek.

Eredményeink új adatokkal szolgálhatnak az egyedülálló tulajdonságokkal rendelkező pDS-ek biológiájával kapcsolatban és valószínűleg hozzájárulhatnak a pDS-ek antivirális válaszában és autoimmun betegségekben betöltött szerepének átfogóbb megértéséhez, mely új terápiás megközelítések kifejlesztéséhez, illetve a jelenlegi terápiák hatékonyságának növeléséhez vezethet.

II. Irodalmi áttekintés

II.1 A DS-ek jelentősége

A veleszületett immunrendszer szervezetünk első védelmi vonala a patogénekkal szemben [1]. Sejtes elemei közé tartoznak a csontvelői pluripotens hematopoetikus őssejtekből (HSC) származó DS-ek is [2]. A DS-eket eredetileg 1973-ban fedezte fel két kanadai tudós, Ralph Steinman és Zanvil Cohn [3,4]. Az általuk egér lépben talált sejtek „dendritikus sejtek” néven váltak ismertté, mivel érésük közben olyan morfológiai változáson mennek keresztül, mely többszörösen megnyúlt dendritikus vagy pszeudopódiumszerű citoplazmatikus nyúlványok létrejöttét eredményezi [3]. A DS-ek a test minden részében megtalálhatóak, többek között a bőrben, a vérben, a nyálkahártyában, valamint az intersticiális szövetek limfoid és nem limfoid területein [5].

Az éretlen DS-ek az immunrendszer őrszemei, mivel folyamatosan ellenőrzik környezetüket. Mint veleszületett immunsejtek, mintázat felismerő receptoraik (PRR) révén felismerik a kórokozókra és a veszély jelekre jellemző patogén (PAMP) és veszély/sérülés (DAMP) asszociált molekuláris mintázatokat, aktiválódnak és akut gyulladáshoz vezetést indukálnak [2]. Az aktiváció hatására érési folyamaton is keresztül mennek, melynek hatására hatékony antigén prezentáló sejtekké (APC) alakulnak és a nyirokszövetekbe vándorolnak [2]. A nyirokszövetekben elsődleges feladatuk, hogy az extracelluláris és intracelluláris fehérjékből származó feldolgozott antigéneket a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákhoz kapcsolva bemutassák a naiv T-sejteknek, elindítva így az adaptív immunválaszt [2,6]. Korábban a DS-eket univerzális, „mindenre alkalmas” APC-ként jellemezték, azonban a kép árnyaltabb, ugyanis több különböző típusú DS létezik, melyek a kórokozók különböző fajtáira specializálódtak és így a naiv T-sejteket is más-más irányba polarizálják [7]. Ez jelentősen növeli az immunrendszer rugalmasságát, így a kórokozók és veszély jelek széles skálájára reagálhat hatékonyan. A naiv T-sejt aktiválás mellett a DS-ek részt vesznek a memória T-sejtek létrehozásában, továbbá aktiválják a B-sejteket is [8,9]. A kórokozókkal szembeni immunválasz kialakítása mellett a DS-ek más jelentős immunfunkciókat is ellátnak, például hozzájárulnak a stabil immunhomeosztázis és így az immuntolerancia fenntartásához, mivel fiziológiai körülmények között is folyamatosan bemutatják a szöveti eredetű saját antigéneket a CD4⁺ és a CD8⁺ T-sejteknek [10].

Felfedezésük óta a DS-ek az orvosi biológiai kutatás középpontjába kerültek, mivel sokrétű immunmoduláló funkciójuk miatt a DS-alapú immunterápiák új irányvonalat képviselhetnek számos betegség kezelésében [11]. A nagy érdeklődést jól bizonyítja a több

mint 90.000 DS-ekkel kapcsolatos PubMed-en megtalálható publikáció. Azonban a DS-eket mégis csak az utóbbi időben, majdnem fél évszázad elteltével kezdtük el csak igazán megismerni az áramlási citometria, a transzkriptomika és a proteomika nagy léptékű fejlődésének köszönhetően. Ma már akár 30-40 antigén egyidejű elemzése is lehetséges áramlási citometriával, ami megkönnyíti az összetett, ritka leukocita populációk elemzését vagy a kiválasztott populáció átfogó fenotipizálását. Az egy-sejtes RNS-szekvenálás segítségével pedig még a DS alcsoportokon belül is új funkcionális alcsoportok különíthetők el [7,12].

A DS-ek különböző altípusai más-más effektor funkcióval bírnak, így változatos immunmoduláló hatásokkal rendelkezhetnek, egyedi tulajdonságaik és jellemzőik miatt pedig számos betegség terápiájában felhasználhatóak. A klinikai vizsgálatok főként a daganatos, az autoimmun és a fertőző betegségek kontextusában vizsgálják a DS-alapú terápiák alkalmazhatóságát [13–18]. A szervezet különböző részeiből származó DS-ek manipulálására számos módszer áll rendelkezésre, melyek terápiás hatású aktivált sejteket eredményeznek. Ezek közé tartozik például a kívánt peptidekkel vagy fehérjékkel feltöltött DS-ek reinfúziója a páciensbe, a DS-ek transzfecciója antigént kódoló vírusokkal vagy nukleinsavakkal, a DS-ek megcélzása nanopartikulomokkal, a specifikus DS-receptorok *in vivo* megcélzása antigén kapcsolt antitestek vagy DS-aktivátorok segítségével, illetve a DS-ekből származó exoszómák alkalmazása [13]. Az aktivált DS-ek immunstimuláló vakcinaként történő felhasználása vonzó alternatívát jelenthet a daganatok terápiájában is [13,16]. A vakcinák eredményessége részben attól is függ, hogy képesek-e a DS-ek a T helper (Th) 1 sejtek, a citotoxikus T-limfociták, illetve a hosszú távú memória T-sejtek kialakulását indukálni a tumor antigénekkal szemben, valamint hogy aktiválják-e a természetes ölősejteket (NK) [13]. A DS-alapú terápiák a fertőző betegségek elleni küzdelemben is fontos szerepet játszhatnak. Egér modellekben a DS-alapú vakcinák védelmet nyújtanak többek között a leishmaniasis, a herpes simplex vírus (HSV), az influenza vírus és a *Candida albicans* fertőzés ellen [13], míg emberekből a humán immundeficiencia vírus (HIV) elleni DS-alapú vakcinák eredményei ígéretesek [17,18]. Az indukált tolerogén DS-ek pedig számos autoimmun betegség (például I-es típusú cukorbetegség, reumatoid arthritis [RA], gyulladáscsökkentő bélbetegségek [IBD], sclerosis multiplex [SM]) laboratóriumi modelljeiben és a korai klinikai vizsgálatokban is ígéretes terápiás opciónak bizonyultak [14,15].

Mivel a vérben alacsony a DS-ek százalékos előfordulása, a legtöbb klinikai vizsgálatban a betegek perifériás véréből származó, rekombináns interleukin (IL)-4 és granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) jelenlétében differenciálódó monociták *ex vivo* manipulációját használják a terápiás DS-ek előállításához [13]. Az első

engedélyezett, előrehaladott áttétes prosztatadaganat kezelésére használt DS-alapú készítmény (sipuleucel-T, Provenge®) is hasonló elven működik, miszerint a betegek autológ perifériás mononukleáris setjeit (PBMC) *ex vivo* prosztata savas foszfatáz/GM-CSF fúziós fehérje jelenlétében aktiválják és expandálják [19].

Más DS altípusok terápiás alkalmazhatóságáról azonban jelenleg kevés információ áll rendelkezésre. Ezért is fektettünk nagy hangsúlyt a monocita eredetű DS-ek (moDS) mellett a ritkább DS alcsoportok funkcióinak tanulmányozására is. A DS altípusok receptormintázatának és az általuk közvetített effektor funkcióknak a megismerése, illetve a DS-receptorok szabályozó mechanizmusainak feltérképezése elősegítheti a hatékonyabb DS-alapú terápiák kifejlesztését a jövőben.

II.2 A DS-ek altípusai és eredetük

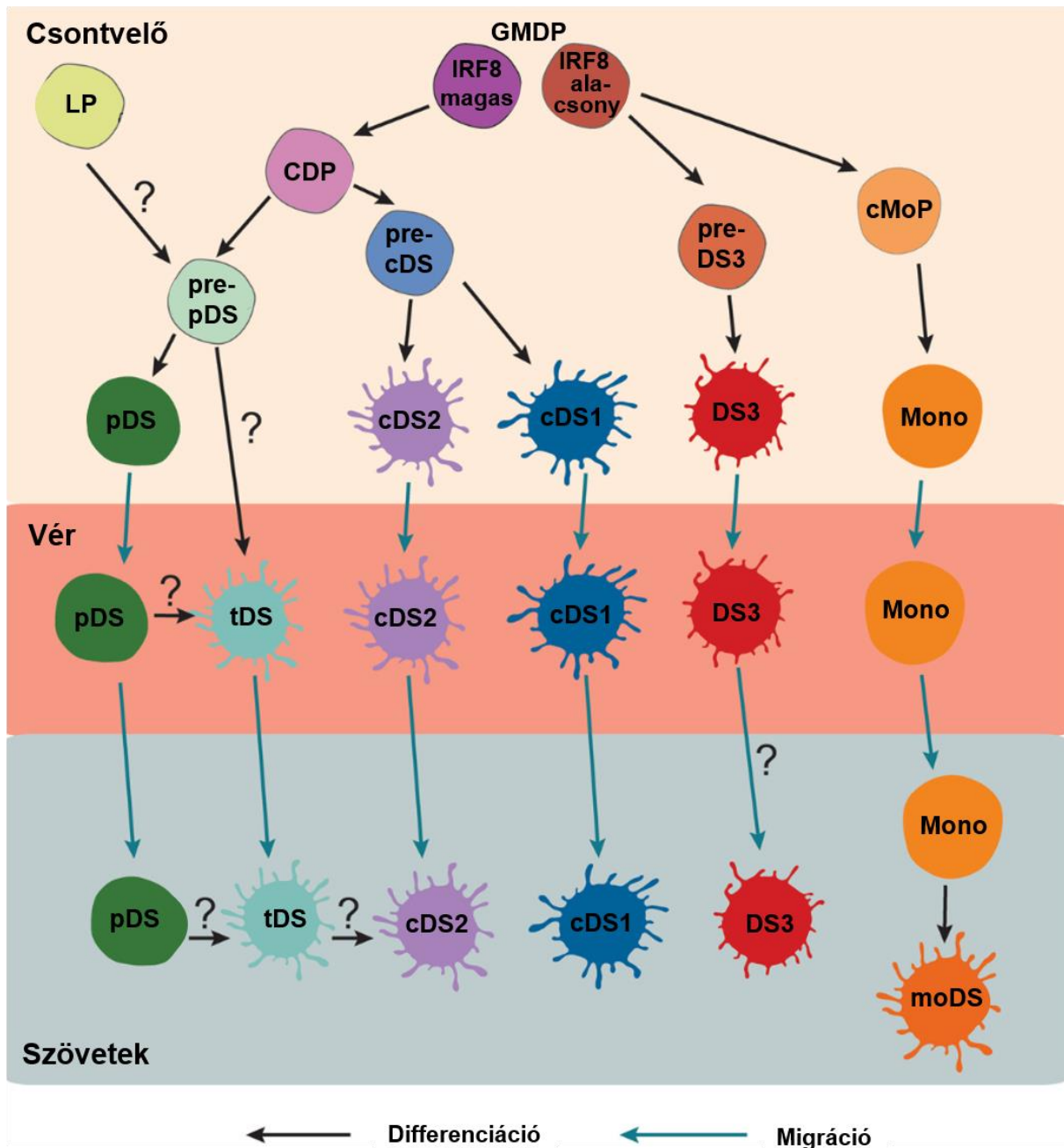
Az új DS sejtfelszíni markerek, az alcsoportokon belüli heterogenitás és a kicsi, de kritikus DS prekursor populációk felfedezése a DS-ek újfajta klasszifikációját tette lehetővé meghaladva a hagyományos limfoid, mieloid DS felosztást.

Az összehasonlító génexpressziós vizsgálatok eredményeképpen a DS-eket elsősorban a sejtfejlődési sor (lineage) alapján osztályozzák, mely korrelál a kulcsfontosságú transzkripciós faktorok eltérő mértékű expressziójával [7]. Ez alapján a humán vérben megkülönböztetjük a plazmacitoid DS-eket (pDS), a „konvencionális” vagy „klasszikus” DS-ek (cDS) két típusát (cDS1 és cDS2), a DS3 alcsoportot, illetve a moDS-eket [7,8,12]. A cDS-ek két alcsoportja megfelel a mieloid DS-ek két alcsoportjának, melyek korábban a CD141 (cDS1) és a CD1c (cDS2) expresszió alapján kerültek meghatározásra embereken [7]. A „mieloid” kifejezés körülbelül két évtizede használatos a humán DS biológiában, továbbra is érvényes a cDS-eken megtalálható közös antigén készlet meghatározására. A CD141 és a CD1c markerek használatának azonban megvannak a korlátai, mivel mindkettő indukálódik a monocita eredetű sejteken *in vivo* és *in vitro* egyaránt [7]. Az utóbbi években egy sor konzisztensebb marker került leírásra, melyek megkönnyítik a DS alcsoportok elkülönítését [7,8,12]. A kép azonban még ennél is árnyaltabb, mivel nem rég leírták, hogy a cDS2 alcsoporton belül is két külön DS csoportot különböztethetünk meg, illetve kiderült, hogy a hagyományos pDS kapuval (CD123 és CD303 pozitivitáson alapuló kapuzás) meghatározott pDS populáció is tartalmazhat mieloid pre-DS-eket (tranzicionális DS, tDS), melyek cDS1 vagy cDS2 prekursorok lehetnek [7,8,12].

A vér DS-jei valószínűleg a perifériás szövetekben és a nyirokszervekben található DS-ek prekursorai. A különféle hámszövetek főként „nem limfoid”, migrációs DS-eket tartalmaznak, melyek feladata az antigén felvétele a periférián, majd annak a nyirokcsomóba

szállítása az afferens nyirokereken keresztül. Az egészséges intersticiális szövetekben nagyszámú CD1c⁺ mieloid DS, CD141⁺ mieloid DS, CD14⁺ intersiticiális DS, azonban viszonylag kevés pDS található [20]. Az epidermisz Langerhans sejtjeit is a migrációs DS-ek közé szokás sorolni, azonban ezek a sejtek fejlődéstanilag nem tartoznak a DS-ek közé [21]. A nyirokszövetek jelentős mennyiségű „limfoid” vagy rezidens DS-et is tartalmaznak. A humán nyirokszövetek CD1c⁺ mieloid DS-eket, CD141⁺ mieloid DS-eket, pDS-eket és különféle CD14⁺ populációkat tartalmaznak [20]. A szövetek és nyirokszervek immunsejt összetétele gyulladás során drámaian megváltozik, elsősorban a granulociták, a monociták és a pDS-ek gyulladt szövetbe történő kivándorlása miatt. A klasszikus CD14⁺ monociták az inflammatórikus DS-ek feltételezett előfutárai, melyek leginkább az *in vitro* körülmények között differenciáltatott moDS-ekre hasonlítanak [22].

Eredetüket tekintve a humán pDS-ek és a pre-cDS-ek a csontvelői közös DS progenitorból (CDP) keletkeznek, mely a magas interferon regulatórikus faktor (IRF) 8 expressziót mutató granulocita-monocita-DS progenitor sejtéből (GMDP) alakul ki. Számos tanulmány leírta, hogy az egerekben a pDS-ek kettős eredettel rendelkeznek, ugyanis a pre-pDS-ek a CDP-ből vagy a limfoid progenitorból (LP) is származhatnak. Hogy ugyanez igaz-e a humán pDS-ekre, még kérdéses, mivel a humán multipotens LP-kből főként cDS1-ek alakulnak ki. A pre-cDS-ek transzkriptomikai szinten heterogének és előzetesen elkötelezettek a cDS1 vagy a cDS2 irányba. Az alacsony IRF8 expressziót mutató GMDP-ből két másik útvonalon jönnek létre a monociták és a DS3 alcsoport. Végül a monociták két különböző fejlődési útvonalon keresztül differenciálódhatnak makrofágokká vagy moDS-ekké (**1. ábra**) [8].



1. ábra. A humán DS altípusok ontogenezise. A DS prekursorok a csontvelőből származnak. A pDS, cDS1, cDS2 és DS3 altípus a többi DS-vonaltól eltérő prekursorokból fejlődik. A moDS-ek a perifériás szövetekben található monocitákból differenciálódnak. A tDS-ek fejlődése még karakterizálásra szorul. A differenciálódást fekete, míg a migrációt kék színű vonallal jelöltük. A kérdőjelek által jelölt útvonalak még tisztázásra várnak. CDP: közös dendritikus sejt progenitor, cMoP: közös monocita prekursor, GMDP: granulocita-monocita és dendritikus sejt progenitor, LP: limfoid progenitor, moDS: monocita eredetű dendritikus sejt, mono: monocita, tDS: tranzicionális dendritikus sejt. Az ábra Elodie Segura munkája nyomán készült [8].

Az IRF8 transzkripciós faktornak alapvető szerepe van a humán DS fejlődésben *in vivo*. A domináns funkcióvesztő IRF8 mutációval rendelkező betegekben a pDS-ek, a cDS1-ek és a cDS2-k száma súlyosan lecsökken [23], de a DS3 szám változatlan [24]. Ezzel szemben a teljes funkcióvesztéssel járó IRF8 mutációval rendelkező betegekben teljesen hiányoznak a

monociták és a DS-ek [24]. A pDS-ek fejlődéséért felelős transzkripciós faktorok közé tartozik továbbá a SpiB és az E2-2 (Tcf4) [25,26]. Emellett az Ikaros hiányban szenvedő betegekben is alacsony a keringő pDS szám [27]. Ezzel szemben az E2-2 funkcióvesztő mutációja vagy delécioja esetén a betegekben a pDS-ek száma normális, de fenotípusuk és funkciójuk megváltozott, mely arra utal, hogy az E2-2 valószínűleg a pDS differenciálódás késői szakaszában vesz részt *in vivo* [28]. A Notch-útvonala aktiválásáról leírták, hogy gátolja a pDS-ek fejlődését, azonban *in vitro* kritikus a cDS1 differenciálódáshoz [29]. A moDS-ek differenciálódását az IRF4, a Blimp-1, az arilhidrogén-receptor és a nukleáris receptor korepresszor 2 irányítja *in vitro* [30, 31].

II.3 A vérben lévő DS altípusok specializált funkciói

Habár minden DS képes antigén prezentálásra, a különböző DS altípusok meghatározott, specializált immunológiai szereppel bírnak. A cDS1-ek például az intracelluláris patogének és a tumorok elleni immunválaszban játszanak fontos szerepet. A cDS1-ekről *ex vivo* kimutatták, hogy stimulálják a naiv CD4⁺ T-sejtek Th1 és Th2 irányú polarizálódását. A cDS1-ek hatékony keresztprezentáló sejtek, kiválóan képesek a nekrotikus sejtekkel asszociált anyagok keresztprezentálására is. *Ex vivo* elősegítik a citotoxikus CD8⁺ T-sejtek differenciálódását. Citokin szekréciójukat tekintve a cDS1-ek főként a III-as típusú IFN-ok termelésére specializálódtak és érdekes módon rezisztensek a produktív vírusfertőzéssel szemben [7,8].

A cDS2-k *in vivo* az immunválaszok teljes skáláját elősegethetik, mivel képesek a naiv CD4⁺ T-sejteket Th1, Th2 vagy Th17 sejtekké polarizálni. A Th17 választ kiválóan indukálják, mivel képesek IL-23-at szekretálni. Emellett a cDS2-k indukálják a legeredményesebben a folliculáris T helper (Tfh) sejteket, mely magas aktivin A és OX40-ligand expressziójuknak köszönhető. Emellett a citotoxikus CD8⁺ T-sejtek differenciálódását is serkentik. A vérben és a nyirokszervekben található cDS2-k ugyanolyan hatékonyak a szolubilis fehérje antigének keresztprezentációjában *ex vivo*, mint a cDS1-ek. Az IL-23 és az aktivin A szekréciója mellett a cDS2-k nagy mennyiségű IL-12-t és IL-1 β -t is termelnek [7,8].

A DS3 alcsoportot 2017-ben egy-sejtes RNS-szekvenálással azonosították humán vérből [32]. Ezt a DS altípust vegyes cDS2-monocita transzkriptom és fenotípus jellemzi. A DS3-ak hatékonyan stimulálják a naiv CD4⁺ T-sejteket, főként Th17 és Th1 polarizációt indukálnak. A naiv CD8⁺ T-sejtek proliferációját is stimulálják, azonban hogy valóban képesek-e keresztprezentációra, még nem tisztázott. Szerepet játszhatnak a szövetrezidens memória T-sejtek kialakulásában is. A DS3-ak a cDS2-ekhez hasonlóan képesek IL-12 és IL-23, valamint a monocitákhoz hasonlóan nagy mennyiségű IL-1 β szekréciójára [8].

Sallusto és kollégái fedezték fel, hogy a humán monociták *in vitro* körülmények között GM-CSF és IL-4 jelenlétében DS-ekké differenciálódnak [33]. *In vivo* ezek a sejtek gyulladás során alakulhatnak ki a periférián. A moDS-ek hatékonyan stimulálják *ex vivo* a naiv CD4⁺ T-sejtek proliferációját, és kontextustól függően előnyösen indukálják a CD8⁺ T-sejtek, a Th17, a Th1 vagy a Tfh sejtek differenciálódását is. A peritoneális moDS-ek képesek szolubilis és partikuláris antigének keresztprezentálására is. A cDS2-khöz hasonlóan a moDS-ekről is kimutatták, hogy az IL-23 és az IL-12 szekréciójára specializálódtak [7,8].

Az AXL⁺ SIGLEC6⁺ DS-eket (tDS) egy-sejtes RNS-szekvenálással azonosították a vérből, mint a CD123⁺ DS-ek alpopulációját [32,34]. Az AXL⁺ SIGLEC6⁺ DS-ek vegyes pDS-cDS transzkriptommal és fenotípussal jellemezhetőek, funkcionálisan azonban közelebb állnak a cDS2-khöz. Hatékonyak a CD4⁺ T-sejtek stimulálásában *ex vivo* és nem szekretálnak I-es típusú IFN-okat [32,34–38]. Az, hogy az AXL⁺ SIGLEC6⁺ DS-ek egy külön DS alcsoportot vagy egy köztes populációt képviselnek-e, még kérdéses. Mivel *in vitro* körülmények között képesek cDS2-vé differenciálódni [24,32,34], így a feltételezések szerint DS progenitorok vagy a pDS-ek és a cDS2-k közötti „átmeneti” populáció lehetnek. Molekuláris ontogenezisük még tisztázatlan, és elképzelhető, hogy közös a pDS-ekével.

A pDS-ek a vírusok elleni immunválaszban játszanak kiemelkedő szerepet, mely többek között egyedülálló I-es típusú IFN termelő képességüknek köszönhető. A pDS-ekről részletesen a következő fejezetben lesz szó.

A főbb DS alcsoportok legfontosabb markereit és funkcióit az **1. táblázat** mutatja be.

Markerek és funkciók	cDS1	cDS2	DS3	moDS	tDS	pDS
Marker gének	CADM1 XCR1 CLEC9A RAB32 C1orf54	CD1C FCER1A CLEC10A CD1E	CD1C FCER1A CD14 VCAN S100A8 S100A9 FCN1 CLEC4E CD36 CD163	CD1C FCER1A CLEC10A S100A9 S100A8 VCAN CD14 FCGR2B STAB1	AXL SIGLEC6 CD123 SIGLEC1 LYZ BCL11A TCF4 KLF12	CD123 BCL11A TCF4
Sejtfelszíni markerek	CD141 ⁺ Clec9A ⁺	CD1c ⁺ CLEC10A ⁺	CD1c ⁺ CD5 ⁻ BTLA ⁻ CD26 ⁻ CD14 ^{low/+} CD163 ⁺	CD1c ⁺ CD14 ⁺ CD226 ⁺ CD163 ⁻ sLSP1 ⁺	CD5 ⁺ CD2 ⁺ CX3CR1 ⁺ CD11c ^{+/-} CD123 ^{+/low}	CD123 ⁺ CD304 ⁺ CD303 ⁺
Fejlődési markerek	IRF8 BATF3 NOTCH	IRF8	IRF8 ^{low} prekurzor sejtekből	IRF4 BLIMP1 AHR NCOR2	E2-2	E2-2 IRF8 Ikaros SpiB
Kereszt-prezentáció	+++	++	?	++	?	+
Prezentáció MHCII-n	++	++	++	++	++	+
CTL indukció	++	+	?	++	?	+
Th1 indukció	++	+	++	++	?	+
Th2 indukció	+/-	++	-	+/-	?	+/-
Th17 indukció	+/-	++	++	++	?	+/-
Tfh indukció	+	++	?	++	?	+
Treg indukció	+/-	++	?	+/-	++	++
IL-12 szekréció	+	++	++	++	+	-
IL-23 szekréció	+/-	++	++	++	?	-
I-es típusú IFN szekréció	++	+	+	+	+	+++
III-as típusú IFN szekréció	++	+	?	+	?	++
Specializált funkció	Intracelluláris patogének, tumorok elleni immunválasz	Extra- és intracelluláris patogének elleni immunválasz	Gyulladás?	Gyulladás	?	Antivirális immunválasz

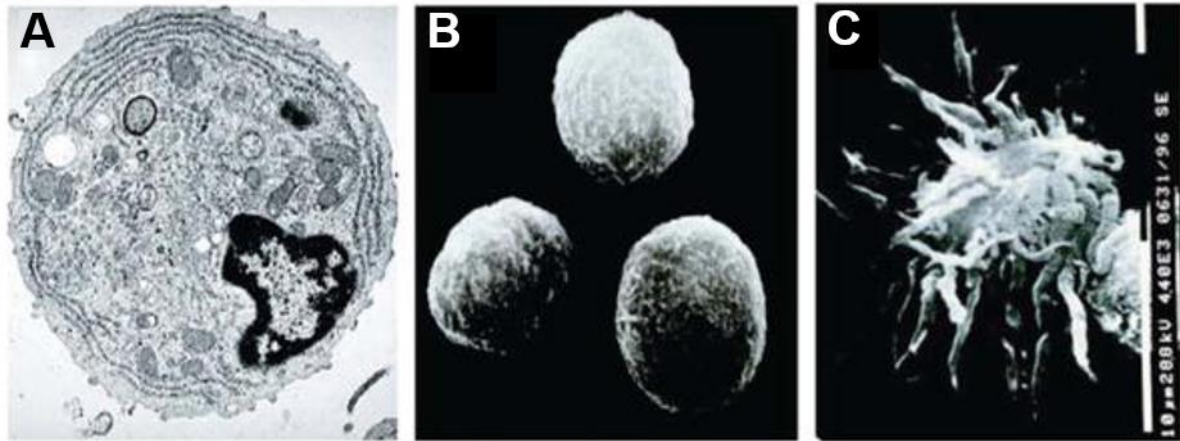
1. táblázat. A főbb humán DS altípusok legfontosabb markerei és funkciói. A különböző DS szubtípusok citokin profilja és T-sejt polarizáló képessége eltérő, melyet nagymértékben befolyásol a sejt érettsége, az alkalmazott aktivációs stimulus, a DS mikroökönyezete, illetve a szöveti homeosztázis felborulását kiváltó ágens természete, így a táblázatban az erre a két funkcióra vonatkozó adatok csak „tájékoztató” jellegűek [7,8,39–56]. A kérdőjel által jelölt funkciók, tulajdonságok még nem ismertek, a „-” jel esetén nem, a „+” jel esetén alacsony, a „++” jel esetén magas, a „+++” jel esetén extrém magas, a „+/-” jel esetén pedig korlátozott mértékben jellemzőek az adott tulajdonságok. cDS: konvencionális vagy klasszikus DS, CTL: citotoxikus T-sejt, IFN: interferon, IL: interleukin, MHC: fő hisztokompatibilitási komplex, moDS: monocita eredetű DS, pDS: plazmacitoid dendritikus sejt, tDS: tranzicionális dendritikus sejt, Tfh: folliculáris T helper, Th: T helper, Treg: regulátor T-sejt.

II.4 Plazmacitoid dendritikus sejtek

II.4.1 A pDS-ek morfológiája

A pDS-ek a DS-ek egy speciális alcsoportját alkotják. Annak ellenére, hogy a vérben rendkívül alacsony a gyakoriságuk - mindössze a PBMC-k 0,2-0,8%-át teszik ki - döntő szerepet játszanak az antivirális immunitásban kiemelkedő I-es típusú IFN termelő képességük révén [57,58]. A humán betegségekben betöltött szerepük is főként IFN termelő funkciójukhoz köthető. I-es típusú IFN termelő képességük hiányában perzisztens vírus fertőzések alakulhatnak ki [59,60], továbbá a rákos sejtek által kiváltott immunszuppresszált állapotokban, mely szintén gátolt IFN szekréciójukkal társul, elősegíthetik a tumorok növekedését [61,62]. Ezzel ellentétben a túlműködésük magas IFN szignatúrával asszociált autoimmun kórképek kialakulását eredményezheti [63,64].

A pDS-eket először humán vérben és mandulák nyirokszövetében azonosították [65]. A pDS-ek excentrikus sejtmaggal és kiterjedt endoplazmatikus retikulummal (ER), illetve Golgival rendelkeznek a plazmasejtekhez hasonlóan (**2.A ábra**), innen ered a plazmacitoid elnevezés [66]. A morfológiájuk mellett a másik leginkább meghatározó tulajdonságuk, hogy virális stimulus hatására gyorsan nagy mennyiségű IFN- α -t képesek termelni, ezért is hívják őket professzionális I-es típusú IFN termelő sejteknek [67,68]. IFN termelő alakjuk kerek, a szekretoros limfocitákéhoz hasonló (**2.B ábra**). Aktiváció hatására azonban a sejtek érésen mennek keresztül, nyúlványokat „növesztenek”, és DS-szerű morfológiát vesznek fel (**2.C ábra**).



2. ábra. A pDS-ek morfológiája. Az elektronmikroszkópos felvételen jól látszik a pDS-ek excentrikus elhelyezkedésű sejtmagja, illetve kiterjedt ER-Golgi membránrendszerük (A). A pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken a pDS-ek kerek, IFN termelő alakja (B), illetve az aktivált, érett sejtek DS-szerű morfológiája látszik (C). Nagyítás: 7000×(A) és 3000×(B,C) [69].

II.4.2 A pDS-ek eloszlása, fenotípusa és receptor mintázata

A pDS-ek folyamatosan termelődnek a csontvelőben és érett sejtekként kerülnek ki a perifériára, ahol már nem képesek osztódni. Viszonylag rövid, néhány napos élettartammal rendelkeznek [70]. Fiziológias körülmények között a pDS-ek a vérben keringenek vagy a másodlagos nyirokszervekben, illetve a csontvelőben tartózkodnak, és alig találhatók meg a perifériás szövetekben [71]. Patológias állapotok esetén (például fertőzés, krónikus gyulladás, daganatok) azonban a pDS-ek elhagyják a keringést és felhalmozódnak az érintett szövetekben. A pDS-ekről leírták, hogy vírusfertőzések során belépnek a nyálkahártyába vagy a bőrbe, illetve számuk megnő az autoimmun betegek gyulladt lézióiban is. Emellett az allergiás betegek orrnyálkahártyájában is kimutatták már őket, valamint a daganatok mikro környezetében is fellelhetőek [72].

A pDS-ek a mieloid cDS-ekkel ellentétben nem expresszálják a CD11c, CD33, CD11b és CD13 mieloid sejtfelszíni antigéneket. Azonban megtartják a CD123 (IL-3R) és a CD45RA GMDP markerek expresszióját, melyek szintje a cDS differenciálódás során lecsökken. Mint minden humán DS, a CD4-et is expresszálják, még hozzá magasabb szinten, mint a mieloid cDS-ek. Ezenkívül a pDS-ek számos sejtfelszíni receptorral rendelkeznek, melyek szorosan részt vesznek fő élettani funkciójuk, az I-es típusú IFN-ok termelésének szabályozásában is. Ezek közé tartoznak a jól ismert humán pDS markerek, mint a CD303 (CLEC4C, BDCA2), a CD304 (neuropilin, BDCA4) a CD85k (ILT3), a CD85g (ILT7), a FcεRI, a BTLA, a DR6 (TNFRSF21/CD358) és a CD300A molekula. A pDS-ek továbbá alacsony szinten expresszálják az MHC II. fehérjét is, melyek szintje aktiváció hatására fokozódik rajtuk

[7,58]. A CD123⁺ pDS-ek egy kis alcsoportjáról leírták, hogy CD2, CD56 és CD5 sejtfelszíni markereket is expresszálnak. Később kiderült, hogy ezeknek a sejteknek a génexpressziós mintázata a pDS-ekétől eltér és inkább a mieloid cDS-ekével fed át. Most már ismert, hogy ez a populáció AXL⁺ SIGLEC 6⁺ pre-cDS-ekből (tDS) áll. A két populáció azonban nem teljesen fedi egymást, ugyanis az AXL negatív pDS-ekről is leírták, hogy expresszálnak CD2-t vagy CD5-öt. Így a teljesen tiszta pDS populáció azonosítására használatos sejtfelszíni markerek kombinációja, ami teljesen kizárja a mieloid pre-DS kontaminációt jelenleg még tisztázásra és megerősítésre vár [7,12].

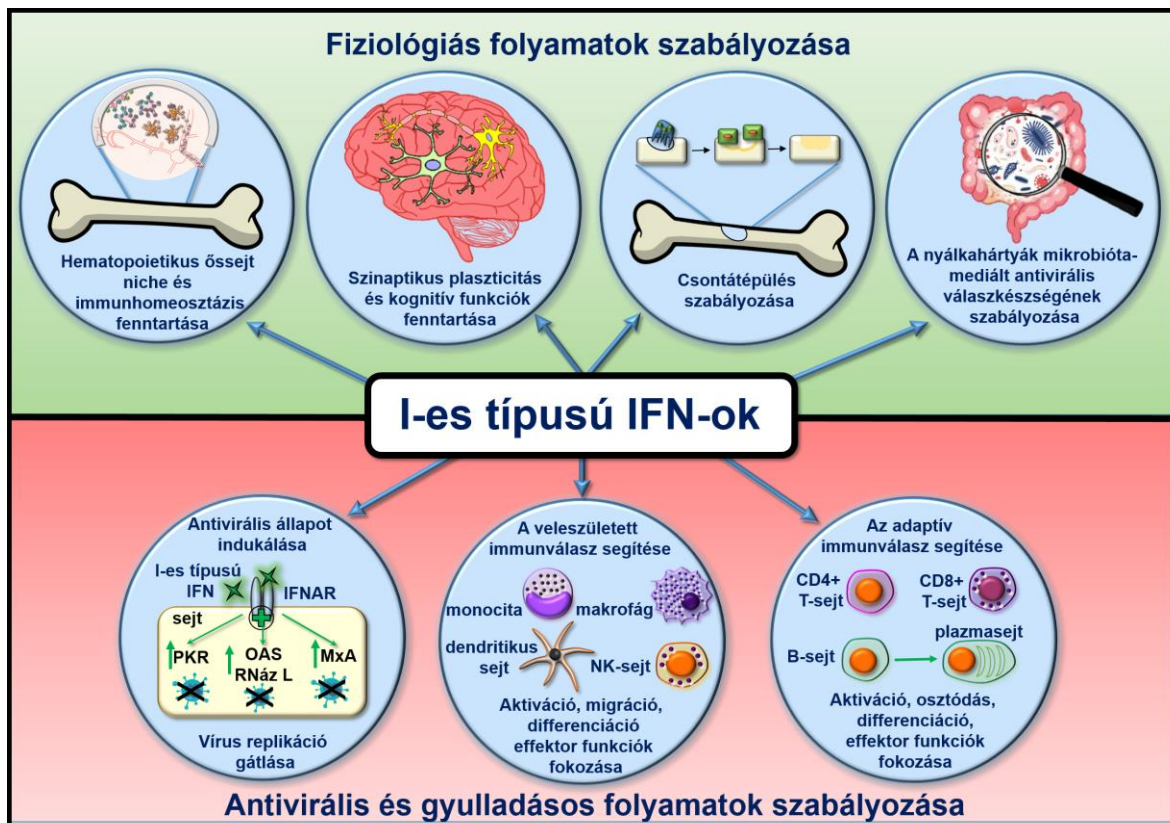
A pDS-ekben magas szinten expresszálódik az endoszomális nukleinsav érzékelő Toll-like receptor (TLR) 7 és 9 [58]. A TLR7 az egyszálú (ss) RNS-t, míg a TLR9 a metilátlan CpG motívumot tartalmazó DNS-t ismeri fel [73]. Továbbá a humán pDS-ek kifejezik a TLR1/2, TLR6 és TLR10 sejtfelszíni receptorokat is [74–76]. Ezenkívül a C-típusú lektin receptorok (CLR) közül a mannóz és a dektin-1, 2, 3 receptorokat, illetve a CD32 scavenger receptort írták még le bennük [71]. A membrán kötött receptorok mellett a pDS-ekben számos citoszolikus nukleinsav szenzor is funkcionál. Munkacsoportunk írta le, hogy a pDS-ekben aktív a retinsav-indukálható gén I (RIG-I)-szerű receptorok (RLR-ek) közé tartozó RIG-I [77] és a melanoma differenciáció asszociált fehérje (MDA) 5 is [78]. Továbbá a ciklikus cGMP-AMP szintáz (cGAS) - interferon gén stimulátor (STING) útvonal is funkcióképes ezen sejtekben [79]. A nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű receptorok (NLR) expressziós profilja a pDS-ekben azonban kevésbé ismert.

A humán pDS-ek PRR-jeinek aktiválódása az IRF és a nukleáris faktor-kappaB (NF- κ B) útvonalon keresztül I-es típusú IFN-ok, illetve pro-inflammatorikus citokinek (TNF- α , IL-6) és kemokinek (IL-8, CCL3, CCL4, CXCL10) termelődéséhez vezet, melynek révén aktív résztvevői a különböző immunológiai folyamatoknak [71].

II.4.3 PDS-ek, mint professzionális I-es típusú IFN termelő sejtek

A pDS-ek az antivirális immunválasz karmesterei, mivel egyedülálló képességük révén gyorsan nagymértékű I-es típusú IFN termelésre képesek. Vírusfertőzések során az I-es típusú IFN-ok fő forrásai a pDS-ek [58]. Így alacsony számuk a vérben, működési zavaruk vagy károsodott I-es típusú IFN termelő képességük növelheti a vírusfertőzések kockázatát. Például a koronavírus okozta megbetegedés 2019 lefolyása is súlyosabb a pDS/IFN tengely diszregulációja esetén, amit munkacsoportunk is leírt egy korábbi összefoglaló publikációban [80]. Az I-es típusú IFN-ok rendkívül pleiotróp hatásokkal rendelkeznek. Vírusfertőzés során antivirális állapotot indukálnak a sejtekben az IFN-stimulált gének expressziójának fokozásán

keresztül, melyek gátolják a vírusok szaporodását és terjedését [81]. Finomhangolják továbbá a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejteinek működését a hatékony antivirális válasz érdekében [82–87]. Emellett az I-es típusú IFN-ok folyamatos alapszintű termelődése számos élettani folyamatot szabályoz, például a vérképző őssejtek működését, a szinaptikus plaszticitást, a csonttépülést és az immunhomeosztázist [88,89]. Továbbá a mikrobióta indukált bazális IFN szignalizáció hozzájárul a nyálkahártya sztróma- és immunsejtjeinek fertőzésekre való előzetes felkészítéséhez is [90–92] (3. ábra).



3. ábra. Az I-es típusú IFN-ok pleiotróp hatásai. Az I-es típusú IFN-ok legismertebb funkciója, hogy gátolják a vírusok replikációját a sejtekben az antivirális fehérjék indukálásán keresztül. Emellett a veleszületett és az adaptív immunválaszra is hatnak, illetve számos más élettani folyamatot, például a csontvelői őssejt niche és a szinaptikus plaszticitás fenntartását, a csonttépülést és a nyálkahártya antivirális válaszkészségét is befolyásolják. IFN: interferon, IFNAR: interferon- α/β receptor, Mx GTPáz: myxovírus rezisztencia guanozin-trifoszfátáz, OAS: 2'-5'-oligo-adenilát-szintetáz, Oligo A: 2'-5'-oligo-adenilát, PKR: protein kináz R, RNáz L: ribonukleáz L. Az ábra az Immunológiai Szemlében megjelent összefoglaló cikkünk ábrája alapján készült [93].

A vírusexpozíciót követő 6 órán belül a pDS-ek transzkripciós aktivitásának 50%-át már az I-es típusú IFN gének expressziója teszi ki [94]. A humán pDS-ek az I-es típusú IFN-ok széles skáláját expresszálják, az IFN- α mind a 13 altípusát, illetve az IFN- β , IFN- ω és IFN- τ egyes altípusait [95]. A pDS-ek emellett III-as típusú IFN-okat (IFN- λ , IL-28/IL-29) is termelnek, azonban az IFN- α -hoz képest körülbelül 10-szer alacsonyabb szinten [96].

Vírusfertőzés hatására a pDS-ek felelősek a mononukleáris sejtek I-es típusú IFN-termelésének 95%-áért, mivel mikrobiális stimulációt követően akár 200-1000-szer több I-es típusú IFN-t képesek termelni, mint bármelyik másik fehérvérsejt [67]. Egyetlen pDS akár 3-10 pg IFN α -t is termelhet erős stimulációra. A pDS-ek IFN- β , IFN- ω és IFN- τ termelése azonban jóval alacsonyabb [97]. A pDS-ek egyedülálló IFN termelő képessége nem magyarázható egyetlen mechanizmussal vagy molekulával. Ehelyett úgy tűnik, hogy több tényező együttes fennállása szükséges hozzá. A pDS-ek I-es típusú IFN termelésének endogén szabályozása is rendkívül komplex, melyet mukacsoportunk összefoglaló közleménye részletesen taglal [57].

A pDS-ek szelektíven expresszálják az endoszómális TLR7 és 9 receptorokat, melyek aktiválása az I-es típusú IFN-ok nagymértékű szekréciójához vezet [98]. Más sejttípusokkal ellentétben a pDS-ek nagyfokú rezisztenciát mutatnak a vírusfertőzésekkel szemben, és nem szükséges az aktív fertőzésük az I-es típusú IFN termeléshez [71], mivel az inaktivált vírusok is képesek stimulálni a pDS-eket [99]. Ha a pDS mégis megfertőződik, az autofágia jelentheti az egyik olyan mechanizmust, melynek révén a citoplazmában replikálódó vírusok hozzáférhetővé válnak az endoszómális kompartmentekben lokalizálódó TLR-ek számára [100]. A pDS-ek azonban nemcsak a szabad vírus partikulát, hanem a legújabb kutatások szerint a vírussal fertőzött sejteket is felismerik. A pDS és az élő fertőzött sejt között limfocita funkció-asszociált antigén 1 (LFA1)- és CD54-mediált „interferogén szinapszis” alakulhat ki [101], melyen keresztül a replikálódó vírus RNS-e a fertőzött sejtekből az éretlen vírusrészecskékkel, a burkolt virionokkal és exoszómákkal együtt átkerülhet a pDS-ekbe [58]. Ez a fizikai kapcsolat TLR7 receptor aktiváción keresztüli lokális IFN termelést eredményez a pDS-ekben, mely a pDS-sel interakcióba lépő, vírussal fertőzött sejt antivirális válaszát segíti. Ez az újonnan felfedezett pDS funkció több előnnyel is jár, mivel a vírusok extracelluláris élettartama viszonylag rövid, továbbá így a nagyon szűk tropizmusú vírusok (például hepatitis vírusok) is felismerhetőek [58].

Amint a pDS-ek endoszómális TLR7 és TLR9 receptoraikon keresztül felismerik a vírusrészecskéket, a mieloid differenciációs primer válasz 88 (MyD88) adaptor fehérjén keresztül beindul a jelátviteli folyamat, ami az IRF7 transzkripciós faktor foszforilációjához és nukleáris transzlokációjához vezet és így az I-es típusú IFN gének átíródását eredményezi [57]. A legtöbb sejttípusban az IRF7 expresszió alapszinten nagyon alacsony és expresszióját az IFN- β termelés első hulláma indukálja interferon- α/β receptor (IFNAR) függő módon. Habár az IRF7 expresszió pDS-ekben nem IFNAR függő, bizonyos vírusokra adott válasz esetén mégis szükséges a teljes funkcionalitáshoz [58]. Ugyanakkor a pDS-ek konstitutívan expresszálják az IRF7-et, ezért korábban úgy gondolták, hogy ez állhat a gyors és nagymértékű IFN szekréciójuk

mögött [102]. A konstitutív IRF7 expressziót valószínűleg az okozza, hogy a pDS-ekből hiányzik az eukarióta translációs represszor fehérje, ami lehetővé teszi az I-es típusú IFN termelés gyors megindulását [103]. A konstitutív IRF7 expresszió önmagában azonban nem elegendő a nagy mennyiségű I-es típusú IFN termeléshez. Honda és munkatársai fedezték fel a TLR9-MyD88 útvonal egyedülálló tér- és időbeli szabályozását a pDS-ekben [104]. A felismerést követően a TLR9 ligandumok, úgymint a CpG-A oligodeoxinukleotidok (ODN) nagy multimer aggregátumokat képeznek a pDS-ek korai endoszómáiban és körülbelül 30 percig ott visszatartásra kerülnek, ez pedig elnyújtott IRF7 aktivációhoz vezet. Így a CpG-A stimuláció hatékonyan fokozza az I-es típusú IFN termelést a pDS-ekben az IRF7-en keresztül, míg alig befolyásolja az NF- κ B aktivitását és ezáltal a sejtek érését. Ez a hatás azonban nagymértékben függ a TLR ligandum szerkezeti tulajdonságaitól. Az ODN-ek más altípusai, mint például a szintén TLR9 agonista, de monomer formájú CpG-B gyorsan a késői endoszómákba szállítódik, ahol aktiválja a TLR9-et, viszont ebben az esetben az NF- κ B útvonal kerül előtérbe, ami gyulladáscitokinek, kemokinek és kostimulátor molekulák szintézisét indukálja, ezért a CpG-B sokkal kevésbé hatékony az I-es típusú IFN termelés beindításában a CpG-A-hoz viszonyítva [104]. A pDS-ek nagy mennyiségű IFN- α termelése CpG-A vagy élő vírus expozíció hatására az első 12 órára tevődik, majd a következő 48 órában ennek a mennyiségnek már csak töredékét képesek megtermelni a restimuláció során [95].

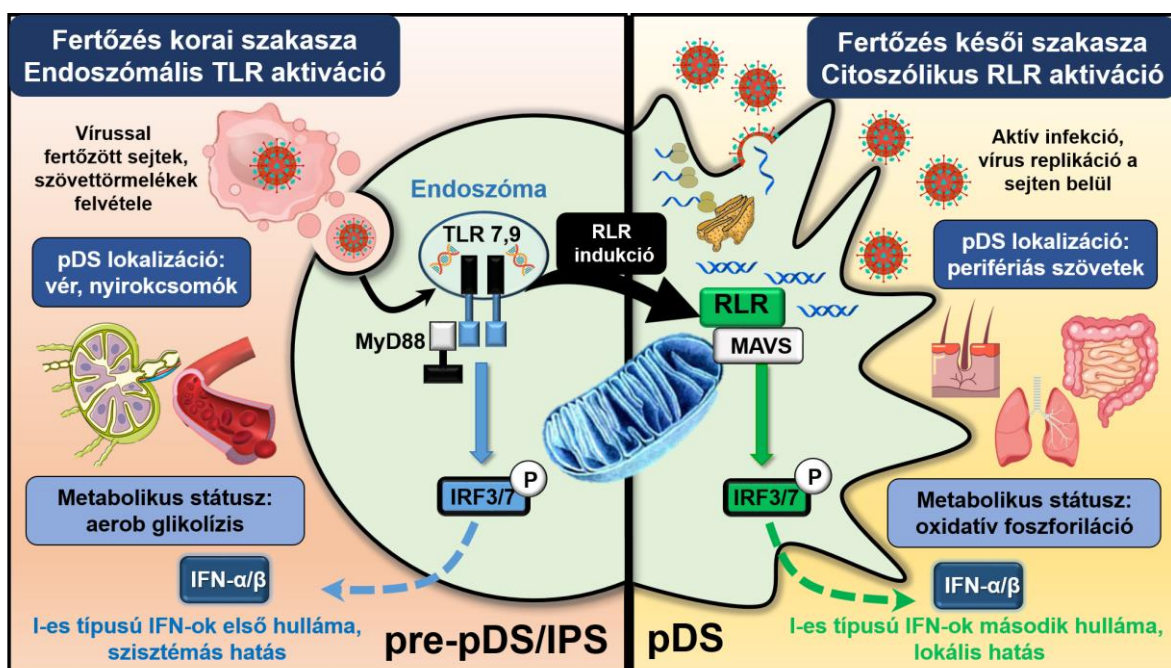
A heterotípusos sejt-sejt interakciók mellett a pDS-ek közötti homotípusos kölcsönhatások is nagy szerepet játszanak az IFN termelés szabályozásában. Megfigyelték, hogy *in vivo* a pDS-ek a TLR aktivációt követő pár órán belül szoros klasztereket alkotnak [105]. *In vitro* is kimutatták, hogy a TLR ligandokra adott I-es típusú IFN válasz mértéke a sejt-sűrűségtől függ [106], ugyanis minél szorosabban helyezkedtek el a sejtek, annál több IFN-t termeltek. Nemrégiben ezt a jelenséget az egyedi sejtek szintjén is megerősítették [107]. A pDS aktiváció kooperatív jellegét ezekben a vizsgálatokban az autokrin/parakrin IFN jelátvitel pozitív hatásával magyarázták. Saitoh és munkatársai leírták, hogy a pDS-ek klaszteresedéséhez az LFA-1 integrinre van szükség, melyet a TLR7 szignalizáció aktivál [108]. Az aktivált LFA-1 indukálja a mikrotubulusok elongációját és a TLR7 pozitív lizoszómákat a sejt perifériájára irányítja. Itt a TLR7 lehetővé teszi a TNF receptor asszociált faktor (TRAF) 3 és a TRAF6 interakcióját, mely az I-es típusú IFN-ek indukációjához vezet [108].

Nemrégben derült fény arra is, hogy a pDS-ek posztaktivációs sorsa eltérő és a sejtek nagyfokú funkcionális plaszticitást mutatnak [58,71,109]. A pDS populáción belül a sejtek nagymértékben különböznek differenciálódási fokukban és következésképpen I-es típusú IFN

termelő vagy antigén prezentáló képességükben. Egy tanulmány egerekben kimutatta, hogy ugyanazon pDS cytomegalovírus (CMV) fertőzés hatására először I-es típusú IFN-t termel, majd képessé válik APS-ként funkcionálni és bemutatni az antigéneket a T-sejteknek. Ez arra utalhat, hogy a pDS-ek különböző, térben és időben összehangolt funkciókat tölthetnek be [110]. Más vizsgálatok szerint a pDS-eknek azonban csak egy része képes I-es típusú IFN-t termelni, függetlenül az alkalmazott stimulációtól. Soumelis és munkatársai három különböző stabil fenotípusú humán pDS populációt azonosítottak, a P1 (PDL1⁺CD80⁻), a P2 (PDL1⁺CD80⁺) és a P3 (PDL1⁻CD80⁺) alcsoportokat [111]. Az eltérő fenotípus mellett morfológiai különbségek is megfigyelhetők a P1, P2 és P3 populációk között. A P1 pDS-ek megtartják plazmacitoid morfológiájukat, míg a P3 pDS-ek dendritikus morfológiával és kevésbé kifejezett ER-rel rendelkeznek, a P2 pDS-ek pedig köztes morfológiát mutatnak. Az összes IFN- α -termelő pDS 80%-a a P1 fenotípusba tartozott a vizsgálat szerint. A P3 pDS-ek nem termelnek IFN-t, hanem magasabb CC-kemokin receptor 7 sejtfelszíni expresszióval rendelkeznek. Továbbá a P3 pDS-ek indukálják a legmagasabb szintű T-sejt proliferációt és a legalacsonyabb szintű PD1 expressziót az aktivált CD4⁺ T-sejteken. A P3 pDS-ek főképp Th2 sejt polarizációt indukálnak, míg a P1 pDS-ek által aktivált T-sejtek több IFN γ -t és IL-10-et termelnek. A kutatók eredményei alapján az aktiváció hatására kialakuló pDS-diverzifikáció független a sejtsztódástól, és nem a prekursor sejtek közötti heterogenitás eredménye. Elképzelhető tehát, hogy miközben egyes pDS-ek megfertőződnek, más pDS-ek felismerik a fertőzött sejteket és válaszként elkezdik termelni az I-es típusú IFN-okat [58].

A pDS-ek nem csak az endoszomális TLR-ek aktivációja során termelnek IFN-okat. Munkacsoportunk modellje alapján a pDS-ek I-es típusú IFN szekréciója két hullámban valósul meg, a PRR-ek különböző altípusainak összehangolt szabályozása mellett [77]. A vírusfertőzés korai fázisában a pDS-ek a TLR7 és TLR9 receptorok folyamatos expressziója révén képesek felismerni a nyirokcsomókba szállított vírusfertőzött sejtek törmelékeit, mely nagy mennyiségű I-es típusú IFN termeléshez vezet, az IFN-ok a vér- vagy nyirokáramláson keresztül a szervezet minden sejtjéhez eljuthatnak és így szisztémás antivirális állapot alakul ki. A szisztémás hatást elősegíti a pDS-ek egyedi lokalizációja is. A cDS-ekkel ellentétben, melyek a perifériás szövetekben, azaz a vírusok bejutási helyén helyezkednek el, a pDS-ek a vérben vagy a nyirokszövetekben, például a nyirokcsomókban található meg. A vírusfertőzés későbbi szakaszában a TLR aktivált pDS-ek a vírus behatolásának helyére vándorolnak, ahol a magas vírus expozíció hatására megfertőződhetnek. A TLR stimuláció a pDS-ekben indukálja a citoszolikus RLR-ek expresszióját is, melyek expressziója előzetes TLR aktiváció nélkül csak elenyésző a pDS-ekben. Ezért a pDS-ek a TLR stimulációt követően képessé válnak a

citoplazmában replikálódó vírusok felismerésére is az RLR-ek által, mely receptorok kifejezeten az aktívan replikálódó vírusok RNS intermedierjeit ismerik fel. A ligand kötést követően az RLR-ekhez kapcsolódó mitokondriális antivirális szignalizációs fehérje (MAVS) az IRF3/7 útvonalak aktiválásához, és így végül az I-es típusú IFN-termelés második (késői) hullámához vezet. Az RLR mediált I-es típusú IFN-termelés alacsonyabb szintű, mint a TLR indukált szekréció, azonban még így is hatékonyan támogatja a lokális antivirális immunválaszt [77]. Míg a pDS-ek TLR-mediált IFN termelése glikolitikus átprogramozást igényel, addig az RLR-indukált IFN szekréció oxidatív foszforiláció függő folyamat, mely szintén csökkenti a pDS-ek megfertőződésének esélyét a periférián [112] (4. ábra).



4. ábra. A pDS-ek I-es típusú IFN szekréciójának két hullámú modellje, mely a vírusfertőzés korai és késői szakaszaiban valósul meg. A fertőzés korai szakaszában a pDS-ek TLR-függő aktivációja nagymértékű I-es típusú IFN szekrécióhoz vezet, mely szisztémás hatással bír. A TLR stimuláció indukálja az RLR-ek expresszióját is a pDS-ekben, mely a fertőzés későbbi szakaszában kisebb mértékű lokális IFN termeléshez vezet a szövetekben. IFN: interferon, IPS: interferon termelő sejt, IRF: interferon regulatórikus faktor, MAVS: mitokondriális antivirális szignalizációs protein, mtROS: mitokondriális reaktív oxigéngyök, MyD88: mieloid differenciációs primer válasz 88, pDS: plazmacitoid dendritikus sejt, RLR: RIG-I-szerű receptor, TLR: Toll-szerű receptor. Az ábra az Immunológiai Szemlében megjelent cikkünk ábrája alapján készült [113].

II.4.4 A pDS-ek szerepe az antibakteriális és az antifungális immunválaszokban

Számos adat utal arra, hogy a pDS-ek nem csupán „vírus specifikus” immunsejtek, hanem a vírusokon kívül a baktériumok és a gombák elleni immunválaszt is alakíthatják. Egy friss vizsgálat kimutatta, hogy a Gram pozitív baktériumok (*Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) nagymértékű I-es típusú IFN, pro-

inflammatorikus citokin termelést, illetve a kostimulációs molekulák megjelenését indukálják a pDS-ekben TLR1/2 függő módon. Továbbá a TLR1 aktivált pDS-ek kiválthatják a CD4⁺ T-sejtek expanszióját és differenciálódását is [76]. Egy másik vizsgálat szerint a *Streptococcus pyogenes* baktérium is indukálja a pDS-ek érését, a pro-inflammatorikus citokin és kemokin termelésüket, illetve az ily módon aktivált sejtek elősegítik a Th1 polarizációt [114]. A *Staphylococcus aureus* a pDS-ek CD32-mediált aktivációjához vezet, melynek hatására antigén specifikus immunválasz is létrejön [115]. Egy másik tanulmányban Williams és munkatársai arról írnak, hogy a pDS-ek hatékonyan képesek felvenni a harcot a *Burkholderia pseudomallei* baktériummal, hasonlóan a mieloid DS-ekhez [116].

A pDS-ek gombák elleni immunválaszáról és antifungális mechanizmusairól jóval többet tudunk. 2004-ben Romani és kollégái leírták, hogy a thymosin alpha 1 nevű peptiddel aktivált, *Aspergillus fumigatus* gombával kezelt egér pDS-ek érési folyamaton mennek keresztül, illetve nő az IL-12 termelésük és Th1 irányba polarizálják a naiv T-sejteket [117]. A *Cryptococcus neoformans* gombából származó mannoпротеinek pedig szintén indukálják a pDS-ek pro-inflammatorikus citokin válaszát [118]. Kimutatták továbbá, hogy a pDS-ek az *Aspergillus fumigatus* hifázását is képesek megakadályozni, illetve a fertőzés *in vivo* egér modelljében a pDS depletált állatok nem voltak képesek leküzdeni az *Aspergillus* fertőzést, mortalitásuk szignifikánsan magasabbnak bizonyult [119]. Felfedezték továbbá, hogy az *Aspergillus fumigatus* hifákkal inkubált pDS-ek a neutrofil granulocitákhoz hasonlóan képesek extracelluláris csapda (ET) kibocsátására. A pDS ET a „pET” elnevezést kapta, mely szintén DNS-ből és citrullinált hiszton H3-ből épül fel [120]. Az egér és humán pDS-ek reaktív oxigén gyök (ROS) termelésük révén direkt módon is képesek gátolni a bekebelezett *Cryptococcus neoformans* gomba növekedését [121]. Tehát az irodalmi adatok alapján, a pDS-ek funkciói jóval szerteágzóbbak, mint azt korábban gondoltuk. Azonban az ígéretes eredmények még megerősítésre szorulnak, így nagy szükség van a pDS-ek eddig leírt antimikrobiális mechanizmusainak átfogó vizsgálatára. Továbbá eddig még nincs arról adat, hogy a pDS-ek antibakteriális vagy antifungális aktivitásában vajon az NLR család pirin domént tartalmazó fehérje 3 (NLRP3)-függő IL-1 β útvonal is szerepet játszhat-e.

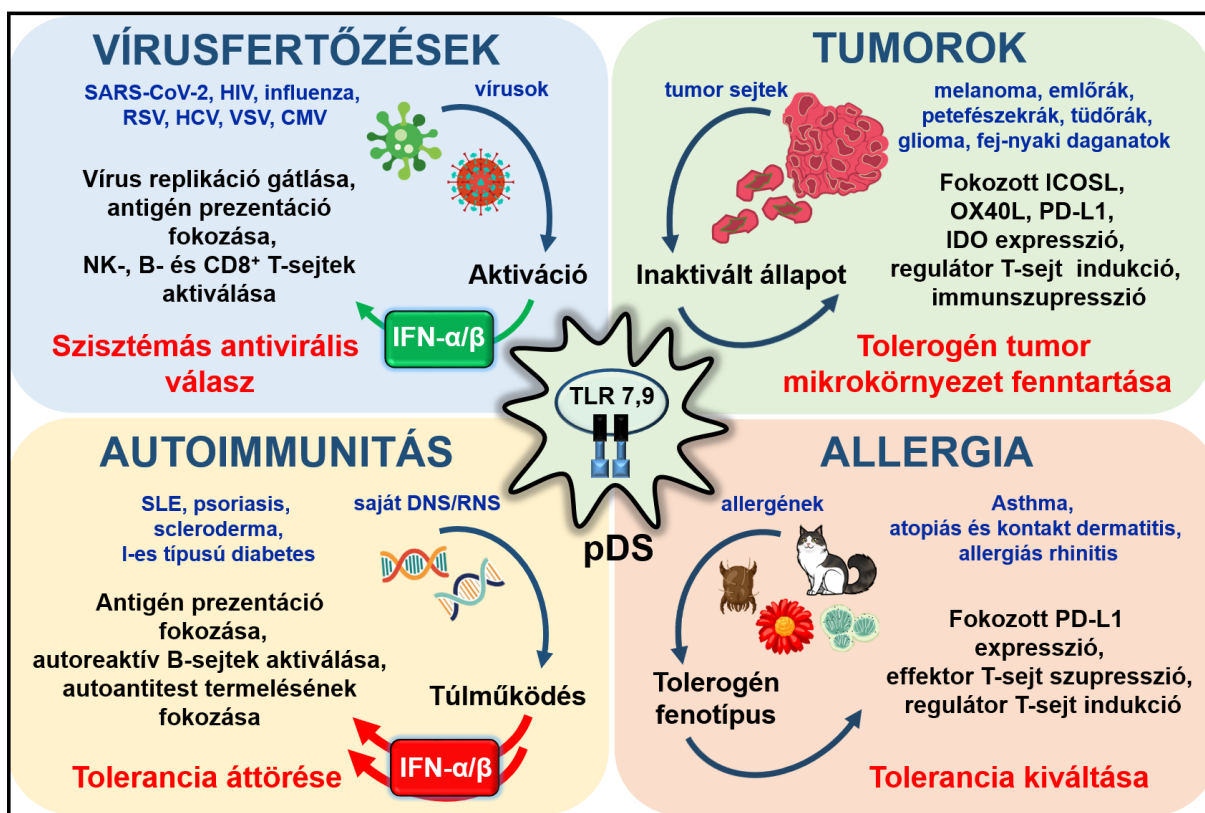
II.4.5 A pDS-ek szerepe humán kórképekben

A pDS-ek egyedülálló IFN termelő képessége nem csak a vírusfertőzések leküzdésében játszik fontos szerepet, mivel egyéb humán betegségek esetében is főként ezen tulajdonságuk hiánya vagy túlműködése vezet patológiás elváltozásokhoz (**5. ábra**). A pDS-eket számos tumor (melanoma, petefészekrák, emlőrák, glioma, fej-nyaki daganatok, vastagbélrák, tüdőrák, hepatocelluláris carcinoma) mikrokörnyezetében leírták már, így szerepük lehet a tumorokban zajló immunológiai folyamatokban [57,61]. A tumor-asszociált pDS-eket általában tolerogén fenotípus jellemzi és így a tumor növekedését támogatják. A pDS-infiltráció rossz prognózissal jár együtt például emlőrákban, petefészekrákban és melanomában is [122–127]. Ennek az az oka, hogy a tumor niche-ben számos daganat eredetű faktor hozzájárulhat a pDS-ek átprogramozásához, melynek eredményeképpen éretlen, tolerogén fenotípusú sejtek alakulnak ki, csökkent IFN- α termeléssel. Így később ezek a sejtek is részt vesznek az immunszuppresszív tumor mikrokörnyezet fenntartásában. Ugyanakkor az aktivált pDS-ek hatékony antitumor választ közvetíthetnek, mivel közvetlen citotoxikus hatással rendelkeznek a granzim- és TRAIL-függő apoptózis indukció révén, valamint IFN- α termelésük közvetett tumorelles hatással is bír. Így a pDS-ek újraaktiválása és I-es típusú IFN-termelő képességük „felélesztése” ígéretes adjuváns terápiaként szolgálhat a daganatos betegségek kezelésében [57] (**5. ábra**).

A daganatokkal ellentétben autoimmun betegségekben a pDS-ek túlaktiválódása és az I-es típusú IFN-ok túltermelődése jellemző. A túlzott pDS aktivitást szinte minden autoimmun vagy gyulladásos betegséggel kapcsolatba hozták már, azonban a pDS-ek patológiás szerepe legjobban szisztémás lupus erythematosusban (SLE) jellemzett [64]. Az SLE-s betegek több mint felénél jelenik meg az interferon gén szignatúra (IGS) [128]. A pDS-ek I-es típusú IFN termelését nukleinsavakat tartalmazó immunkomplexek, antimikrobiális peptidekkel alkotott DNS-komplexek, neutrofil ET-k és az oxidált mitokondriális DNS aktiválhatja [58]. A pDS-ek azonban nemcsak az immunkomplexek által kiváltott gyulladáshoz, hanem az autoantitestek termeléséhez is hozzájárulnak SLE-ben az autoreaktív B-sejt klónok aktivációján keresztül [129]. A pDS-ek egy másik IGS-sel jellemzett betegség, a psoriasis kialakulásában is szerepet játszhatnak [130]. A psoriasis fellángolását gyakran bőrsérülések váltják ki (Köbner jelenség). A pDS-ek a bőrsérülések során aktiválódhatnak, ugyanis az LL37 antimikrobiális peptid a saját eredetű ssRNS-sel vagy DNS-sel komplexben a pDS-ek endoszómális TLR-jeinek perzisztens és fokozott aktivációjához vezet, mely nagy mennyiségű I-es típusú IFN termelést indukál [131]. Továbbá leírták, hogy az I-es típusú IFN-kezelés gyakran közvetlenül indukálja a psoriasis kialakulását vagy súlyosbítja a tüneteket, míg az I-es típusú IFN-ok jelátviteli útvonalának gátlása állatmodellekben hatékonyan gátolja a T-sejt közvetített bőrgyulladás és a

psoriasisához hasonló gyulladásos betegségek kialakulását [131]. Így a daganatellenes terápiákkal ellentétben az IGS-asszociált autoimmun betegségek kezelésében a túlzott I-es típusú IFN-termelés csökkentése a cél, mely javíthatja a betegek életminőségét [57] (5. ábra).

A pDS-ek az allergiás megbetegedésekben is fontos szerepet játszanak. Szerepüket eddig leginkább allergiás eredetű asthmában vizsgálták és a kísérletes eredmények többsége arra utal, hogy tolerogén funkcióiknak köszönhetően enyhíthetik a klinikai tüneteket és lassíthatják a betegség progresszióját. Jótékony hatásuk IFN termelésükkel magyarázható, mivel az I-es típusú IFN-ok képesek gátolni a Th2 sejtek fejlődését, a 2-es típusú veleszületett limfoid sejtek (ILC) funkcióit, a Th2 citokinek szekrécióját és az immunglobulin (Ig) E izotípusváltást. Továbbá a pDS-k indukálják a regulátor T-sejtek expanszióját is, így toleranciát válthatnak ki allergiás eredetű betegségekben [57] (5. ábra).



5. ábra A pDS-ek szerepe vírusfertőzésekben és humán betegségekben. A pDS-ek megfelelő működése szükséges a hatékony antivirális immunválaszhoz, valamint az immunológiai tolerancia kiváltásához allergiás megbetegedésekben. Ezzel szemben daganatos betegségekben a tumor sejtek hatására kialakuló inaktivált állapotuk a tolerogén tumor mikrokörnyezet fenntartásához járul hozzá, míg túlműködésük a tolerancia áttöréséhez vezet, és így autoimmun betegségekkel köthető össze. ICOSL: indukálható T-sejt kostimulátor ligand, IDO: indolamin 2,3-dioxigenáz, IFN: interferon, OX40L: OX40 ligand, PD-L1: programozott halál-ligand 1, pDS: plazmacitoid dendritikus sejt, SLE: szisztémás lupus erythematosus, TLR: Toll-szerű receptor. Az ábra az Immunológiai Szemlében megjelent cikkünk ábrája alapján készült [113].

II.4.6 PDS sejtmodellek

Mint már említettük, a pDS-eket nehéz vérből izolálni, nem osztódnak, illetve sejt kultúrában tartva kevesebb, mint 72 óra alatt elpusztulnak. A mieloid DS-ekkel ellentétben nincs standardizált protokoll a pDS-ek *in vitro* létrehozására hematopoietikus prekursorokból, ezért a humán pDS-ek biológiájának tanulmányozása nagy kihívást jelent az immunológusok számára. A pDS-kutatás megkönnyítésére több kutatócsoport is megpróbált sejt vonalakat létrehozni leukémiás pDS-ekből. A CAL-1 pDS sejt vonal GM-CSF és IL-3 jelenlétében érett DS-szerű morfológiát vesz fel, azonban a CAL-1 sejtek nem képesek IFN- α szekrécióna, így a pDS-ek antivirális válaszána tanulmányozására nem alkalmasak [132]. A GEN2.2 sejtek ezzel szemben virális stimulus hatására nagymértékű I-es típusú IFN szekrécióna képesek [133]. A GEN2.2 sejtek hosszú távú tenyésztéséhez és fenntartásához MS-5 feeder sejt szőnyegre van szükség. Nem ismert azonban, hogyan hatnak az MS5 sejtek a GEN2.2 sejtek citokin, illetve kemokin szekrécióna, illetve saját eredményeink alapján e sejtek gyenge antigénprezentáló képességgel rendelkeznek. Az „újabb” GEN3 sejt vonal azonban már hatékonyan keresztprezentálja az influenzavírus fertőzött sejtekből származó vírusantigéneket [134].

A fenotípusos és funkcionális vizsgálatok mellett génexpressziós microarray vizsgálattal is megerősítették, hogy a GEN2.2 sejtek és a primer humán pDS-ek közös génexpressziós programon osztoznak, így releváns sejtmodellként használhatók a pDS-ek biológiájána tanulmányozására [135].

II.5 Citoszólikus szenzorok

Mint korábban már említettük, a DS-ek, így a pDS-ek is fel vannak szerelve különböző PRR-ekkel. A PRR-eket elsősorban az APS-ek fejezik ki, de más veleszületett immunsejtekbén, illetve nem immunsejtekbén is megtalálhatóak [136]. A különböző PRR-ek az extra- és intracelluláris kórokozók PAMP-jait, illetve az endogén eredetű veszély jeleket ismerik fel [137].

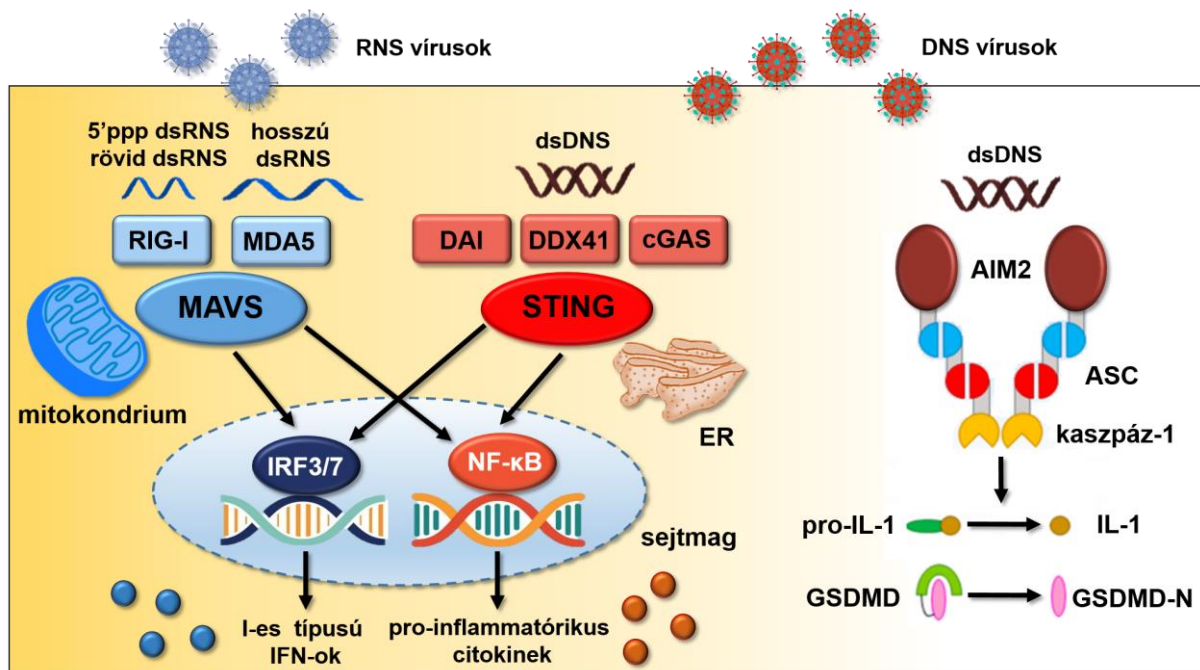
Az extracelluláris kórokozók jellemzően elpusztulnak, ha a gazdaszervezet fagocita sejtjei internalizálják őket, így csak a sejtén kívüli extracelluláris térben tudnak szaporodni. Sok ebbe a csoportba tartozó mikroba rendelkezik ezért például tokkal, mely megakadályozza a fagocitózist [138]. Felismerésükre ezért olyan sejt felszíni receptorok alakultak ki, melyek főleg a kórokozók sejt fal, illetve burok komponenseit érzékelik. A plazmamembrán TLR-ek például a Gram pozitív baktériumok sejt falát alkotó lipoteikólsav, a Gram negatív baktériumok sejt falában található lipopoliszacharid (LPS), illetve a lipoproteinek felismerésére

specializálódtak [139], míg a CLR-ek főként a gombák felszíni szénhidrát molekuláit (mannóz, α -mannán, β -glukán) kötik meg [140].

Számos patogén életciklusa a gazdasejt citoplazmájának megfertőződésével jár. Egyes baktériumok és paraziták változatos menekülési útvonalakkal rendelkeznek, például „lyukat ütnek” a fagoszóma membránján, így a kórokozó kijuthat a citoplazmába. A vírusok génjei gyakran a citoplazmában íródnak át és transzlálódnak, illetve a vírusrészecskék is a citoplazmában szerelődnek össze. Ezért a patogének külső és belső komponenseinek, valamint a celluláris sérülés asszociált jelek felismerésére a sejteknek rendelkezniük kell citoszólikus PRR-ekkel is, melyek alapvető fontosságúak a veleszületett immunválasz aktiválásában és a kórokozók eltávolításában [137].

Nagyon sok intracelluláris receptor specializálódott a patogének belső PAMP-jainak, főként a nukleinsavaknak a felismerésére. Ezek közé a citoszólikus PRR-ek közé tartoznak az RLR-ek, az absent in melanoma 2 (AIM2)-szerű receptorok (ALR) és a STING-et aktiváló cGAS, DAI, illetve DDX41 [141,142]. Az RLR-ek a citoszólikus RNS-t, míg az ALR-ek és a STING-en keresztül szignalizáló fehérjék a citoszólikus DNS-t ismerik fel (**6. ábra**). Az NLR-ek egyes típusai is képesek lehetnek a citoszólikus nukleinsavak felismerésére, azonban ezen receptoroknak nem ez a fő funkciója és aktivációjuk kimenetele is eltérő, amit egy későbbi fejezetben részletezünk [137,143].

A MAVS és a STING adaptor proteint használó citoszólikus szenzorok ligandum kötése az IRF3, az IRF7 és az NF- κ B transzkripciós faktorok aktiválásához vezet, mely az I-es típusú IFN-ok, illetve a pro-inflammatórikus citokinek expresszióját indukálja [137,143]. Az AIM2 aktiválódása pedig a biológiailag aktív IL-1 családba tartozó citokinek felszabadulását eredményezi (**6. ábra**).



6. ábra. Nukleinsav felismerésre specializálódott intracelluláris receptorok. A legtöbb citoszólikus nukleinsav szenzor aktiválódása a MAVS vagy a STING adaptor fehérjén keresztül az I-es típus IFN-ok és a pro-inflammatorikus citokinek szekrécióját eredményezi. Az AIM2 ligand felismerése a biológiailag aktív IL-1 citokinek kialakulásához vezet. 5'ppp: 5'trifoszfát, AIM2: absent in melanoma 2, cGAS: ciklikus GMP-AMP szintáz, DAI: interferon regulatórikus faktor DNS dependens aktivátora, DDX41: DEAD-box helikáz 41, ds: kétszálú, ER: endoplazmatikus retikulum, GSDMD: gazdermin D, IFN: interferon, IRF: interferon regulatórikus faktor, MAVS: mitokondriális antivirális szignalizációs fehérje, MDA5: melanoma differenciáció asszociált fehérje 5, NF-κB: nukleáris faktor-kappaB, RIG-I: retinsav-indukálható gén I, STING: interferon gének stimulátora.

A fentebb említett citoszólikus nukleinsav szenzorok közül munkacsoportunk főként az RLR-ek funkcióinak tanulmányozásával foglalkozik. Mint korábban már leírtuk, míg a cDS-ek alapszinten is kifejezik ezeket a receptorokat, addig a pDS-ekben expressziójuk aktiváció-függő [77]. Az RLR-ek RNS-szenzorok, melyek a vírusok replikációs intermedierjeit ismerik fel és nélkülözhetetlenek az antivirális immunválasz és az I-es típusú IFN-ok indukciójához. A fehérje családnak három tagja van: a RIG-I, az MDA5 és a genetikai és fiziológiai laboratórium 2 protein. A RIG-I elsősorban az 5'trifoszfát (5'ppp) csoportokat tartalmazó rövid kétszálú (ds) RNS szekvenciákat, míg az MDA5 főként a hosszú dsRNS-eket ismeri fel [144,145].

Minden RLR rendelkezik egy központi helikáz doménnel és egy karboxi-terminális represszor doménnel. Ez a két domén együtt felelős az immunstimulatórikus RNS-ek felismeréséért. A RIG-I és az MDA5 emellett két N-terminális kaszpáz aktivációs és toborzó domént (CARD) is tartalmaz, melyek a downstream jelátvitelt közvetítik. A RIG-I és az MDA5 az RNS-kötés és oligomerizáció után kölcsönhatásba lépnek adaptor proteinjük, a MAVS CARD doménjével. A MAVS ezután aktiválja a TANK-kötő kináz 1-et (TBK1) és az IκB-

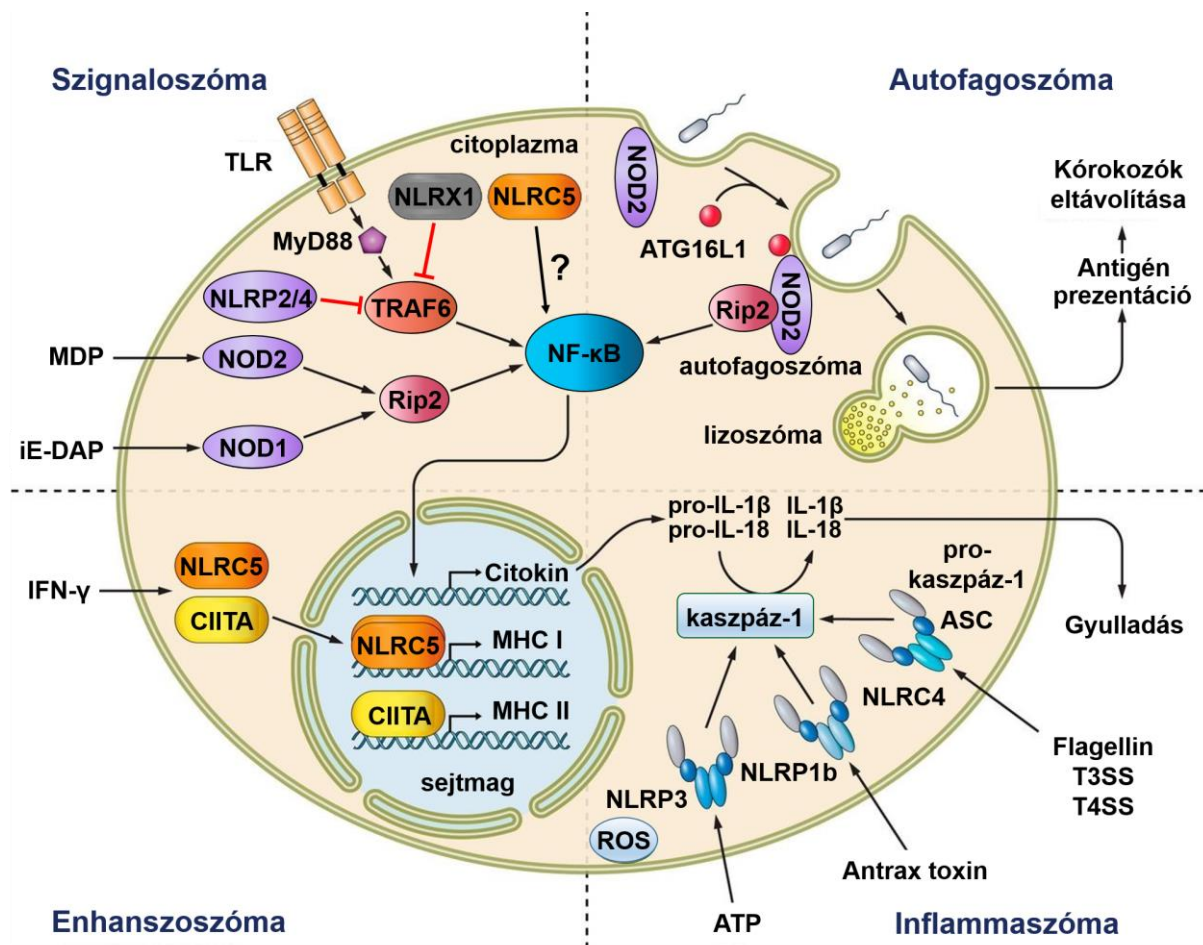
kinázt (IKK), mely az IRF3 és az IRF7 aktivációjához vezet, ezek pedig az NF- κ B-vel együtt indukálják az I-es típusú IFN-ok és más antivirális gének átírását [144,145]. Ez összességében a fertőzött sejtek apoptózisát, a környező sejtek védelmét és az antigénspecifikus antivirális immunválasz aktiválódását eredményezi. Így az RLR-ek kiemelkedő szerepet játszanak az RNS vírusok által okozott fertőzések kontrollálásában.

II.6 A sokszínű NLR-ek

Az NLR-ek szintén az intracelluláris szenzorok nagy családjához tartoznak. Szerkezetüket tekintve az NLR-ek mindegyike rendelkezik egy közös C-terminális leucinban gazdag ismétlődő (LRR) doménnel, mely a ligand felismerésért felelős; egy központi NOD, más néven NACHT doménnel, mely nukleotid kötéskor elindítja a receptor aktiválódását és oligomerizációját; és egy N-terminális doménnel, mely különböző adaptor fehérjékhez kötődve downstream jelátviteli útvonalakat aktivál. Az N-terminális effektor domén alapján az NLR-eket négy alcsaládra osztják. Az NLRA alcsalád savas transzaktivációs doménnel rendelkezik, és csak egy tagból, a II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex transzaktivátorból (CIITA) áll. Az NLRB alcsalád egy baculovirális apoptózis gátló fehérje ismétlődő doménnel rendelkezik. Az NLRA alcsaládhoz hasonlóan az NLRB alcsaládnak is csak egy tagja van, az NLR család apoptózist gátló fehérje. Az NLRC alcsalád egy CARD doménnel rendelkezik, és a fent említett két családdal ellentétben az NLRC alcsalád hat receptorból áll: NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2), NLRC3, NLRC4, NLR család CARD domént tartalmazó 5 (NLRC5) és nukleotidkötő domént és leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó fehérje X1 (NLRX1). Az NLRP alcsalád egy pirin doménnel (PYD) rendelkezik, és 14 tagját (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP7, NLRP12, NLRP5, NLRP6, NLRP8, NLRP9, NLRP10, NLRP11, NLRP13, NLRP14) tekintve az NLR-ek legnépesebb alcsaládjá [146].

Az NLR-ek alapvető szerepet játszanak a PAMP-ok és a DAMP-ok felismerésében, és a veleszületett immunrendszer effektor funkcióinak indukálásában. Emellett az NLR-ek pozitívan vagy negatívan szabályozhatnak különböző sejtfolyamatokat is. Eddig 22 humán és legalább 34 egér NLR-t azonosítottak [147]. Egyedi funkciójuk alapján az NLR-ek négy alcsoportba sorolhatóak. Számos NLR képes multifehérje-komplexeket, inflammaszómákat alkotni, melyek aktivációja a pro-IL-1 β és pro-IL-18 pro-inflammatórikus citokinek érett, biológiailag aktív formájának kialakulásához szükséges. Az NLR-ek közül az NLRP1, az NLRP3 és az NLRC4 molekulákról írták le, hogy képesek inflammaszómák kialakítására. Ezzel szemben a regulatórikus NLR-ek a más PRR-ek által indukált intracelluláris jelátviteli kaszkádokat, például az NF- κ B, az I-es típusú IFN vagy a mitogén-aktivált protein-kináz

(MAPK) útvonalakat szabályozzák. Regulatórikus NLR a NOD1, a NOD2, az NLRC5, az NLRX1, az NLRP12 és az NLRC3. Az NLR-ek egy speciális alcsoportját alkotják az NLRC5 és a CIITA fehérjék, melyek enhanszoszómaként működnek, és az MHC I., illetve II. gének transzkripcióját szabályozzák. Továbbá bakteriális stimulus hatására egyes NLR-ek, mint például a NOD1 és a NOD2, képesek az ATG16L1 autofágiát moduláló fehérjét a sejtmembránhoz kötni, mely az autofagoszómák képződését segíti elő [146,148]. Az NLR-ek főbb funkcióit a 7. ábra foglalja össze.



7. ábra. Az NLR-ek funkciói. Az NLR-ek nem csupán klasszikus PRR-ek, hanem részt vesznek más jelátviteli útvonalak, az autofágia, illetve az MHC gének transzkripciójának szabályozásában is, valamint multiprotein inflammaszóma komplexeket is képezhetnek. ATP: adenzin-trifoszfát, CIITA: II. osztályú fő hisztokompatibilitási komplex transzaktivátor, iE-DAP: γ -d-glutamil-mezo-diaminopimelinsav, IFN: interferon, MDP: muramil-dipeptid, MHC: fő hisztokompatibilitási komplex, MyD88: mieloid differenciációs primer válasz 88, NF- κ B: nukleáris faktor- kappab, NLRC: NLR család CARD domént tartalmazó fehérje, NLRP: NOD-szerű receptor pirin domént tartalmazó fehérje, NLRX1: nukleotidkötő domén és leucinban gazdag ismétlődést tartalmazó fehérje X1, NOD: nukleotid-kötő oligomerizációs domén, Rip2: receptor interakciós szerin/ treonin kináz 2, ROS: reaktív oxigén gyök, T3SS: 3-as típusú szekréciós rendszer, T4SS: 4-es típusú szekréciós rendszer, ATG16L1: autofágia kapcsolt 16-szerű fehérje 1, TLR: Toll-szerű receptor, TRAF6: TNF receptor asszociált faktor 6. Az ábra Motta és kollégái munkája nyomán készült [146].

II.6.1 Regulátorikus NLR-ek

Változatos funkcióik miatt a regulátorikus NLR-ek az immunológiai kutatások fókuszába kerültek, ugyanis a gyulladási reakciókat szigorúan szabályozni kell, hogy az immunhomeosztázis fennmaradjon. Egyrészt a gazdaszervezetnek elég erős immunválaszt kell indítania ahhoz, hogy a kórokozót eliminálja a szervezetből, másrészt az immunválaszt finomhangolni is szükséges, így megelőzve a járulékos szöveti károsodást. A regulátorikus NLR-ek szinergista vagy antagonisták módon hathatnak a más PRR-ek által indukált jelátviteli útvonalakra, a hatás pedig az adott sejt, receptor vagy ligandum típusától függ. Az NLR-ek képesek többek között szabályozni az NF- κ B, a MAPK és az I-es típusú IFN útvonalakat [149].

Így például a NOD1 és a NOD2 bakteriális szenzorok pozitív regulátorikus NLR-ek, mivel fokozzák a gyulladási válaszokat. A ligandum érzékelés hatására a NOD2 oligomerizálódik és különböző fehérjéket toboroz, mely egy multifehérje-komplex kialakulásához vezet. Ezt a komplexet NODoszómának nevezzük, mely elősegíti az I-es típusú IFN szignalizációt és modulálja az NF- κ B útvonalat is [149]. Ezzel szemben az NLRC3 és az NLRP12 negatív regulátorikus NLR-ek, melyek fő funkciója a nem kívánt gyulladás megelőzése. Az inflammaszómához és a NODoszómához hasonlóan ezek az NLR-ek is képesek multifehérje-komplexek, úgynevezett TRAFoszómák kialakítására. Az NLRC3 gátolja az NF- κ B jelátvitelt és az I-es típusú IFN-választ különböző fehérje interakciók révén [150, p3]. Az NLRP12 a kanonikus és a nem kanonikus NF- κ B jelátvitel negatív szabályozója és szerepet játszik az extracelluláris jel szabályozott kináz útvonal gátlásában is [151].

A fent említett receptorok mellett az transzaktivátor funkciót is ellátó NLRC5-ről is kiderült, hogy regulátorikus NLR, mely negatívan képes befolyásolni a TLR- és RLR-mediált NF- κ B és I-es típusú IFN választ [152–154]. Az NLRX1-ről pedig leírták, hogy a gyulladási reakciók negatív szabályozója, azonban később ellentmondásos eredmények jelentek meg az immunválaszban betöltött szerepéről [155–159], amit a következő fejezetekben részletezünk.

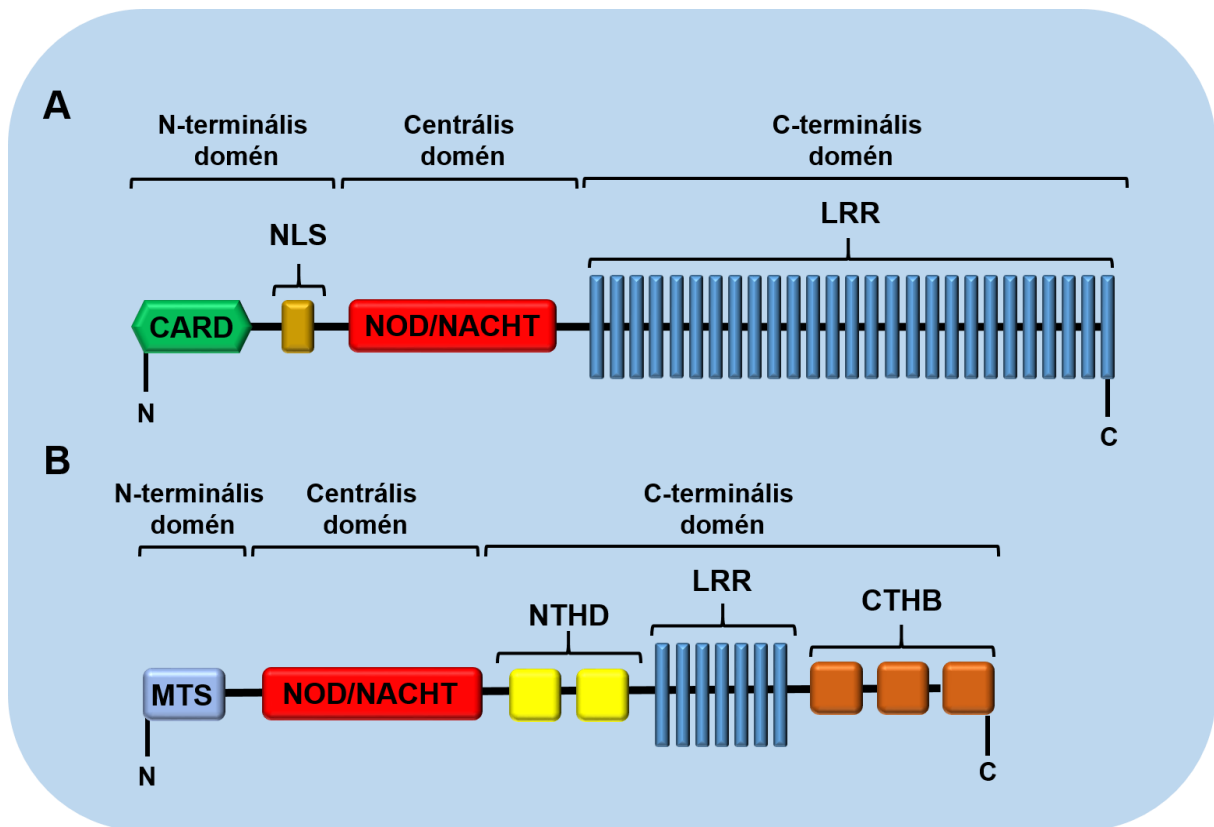
II.6.1.1 Túl az enhanszoszómán: NLRC5

Az NLRC5-öt eredetileg 2010-ben klónozták, a humán génje körülbelül 96 kilobázispár hosszúságú és a 16q13 kromoszómán található [160,161]. A kódolt polipeptid 1866 aminosavból áll és körülbelül 200 kDa molekulatömegű [162]. Az NLRC5 szerkezete hasonlít a más NLR-eknél is megfigyelt három doménes szerkezethez (**8.A ábra**). Az NLRC5 N-terminális CARD-ja azonban nem mutat nyilvánvaló szekvencia hasonlóságot a tipikus CARD-okkal, ezért atipikus CARD-nak is nevezik. Az NLRC5 NOD doménja Walker A és Walker B motívumokat tartalmaz, melyek fontosak a nukleozid-trifoszfát (NTP) kötésben, illetve az NTP

hidrolízisében. Az NLRC5 az NLR fehérjecsalád legnagyobb tagja, mivel a C-terminális régiójában szokatlanul hosszú, 27 LRR-ből álló szakasz található. Az NLRC5 szerkezete számos emlősfajban erősen konzervált, például a humán NLRC5 és az egér NLRC5 homológiája 64%, ami arra utal, hogy az NLRC5-nek hasonlóan döntő fontosságú funkciói vannak az eltérő fajokban [162].

Az NLRC5 főként a csontvelőben, a humán THP-1 sejtekben, a B-sejtekben, valamint a primer mieloid és limfoid sejtekben expresszálódik [163]. Ez arra utalhat, hogy az NLRC5 esszenciális szabályozó szerepet játszhat az immunmediált betegségek kialakulásában. Korábban megállapították, hogy az NLRC5 expressziója a citoplazmára korlátozódik, így a fehérje felismerheti az intracelluláris veszély jeleket [164]. Ezzel szemben Meissner és munkatársai leírták, hogy az NLRC5 a citoplazmában és a nukleáris kompartmentben egyaránt megtalálható [165]. Az NLRC5 ráadásul a CIITA-hoz hasonló transzkripció szabályozó tulajdonságokkal is rendelkezik, mely molekuláról jól ismert, hogy képes ingázni a sejtmag és a citoplazma között [163]. Eddig úgy tűnik, hogy az NLRC5 gyakrabban található meg a citoplazmában a magas NLRC5 expresszióval jellemezhető sejtekben, míg a nukleáris lokalizáció gyakrabban volt megfigyelhető az alacsony NLRC5 expresszióval jellemezhető sejtekben [165]. Mivel a fehérje túl nagy, a nukleáris pórusokon keresztül nem képes passzívan bediffundálni a sejtmagba. Transzportja valószínűleg CRM1-függő módon történhet [165]. Az NLRC5 rendelkezik egy nukleáris lokalizációs jellel is a CARD és a NOD domén közötti régióban, melynek mutációi blokkolják az NLRC5 transzlokációját a citoplazmából a sejtmagba [165].

Míg az NLRC5 transzaktivátor szerepe viszonylag már jól dokumentált az MHC I. génnek expressziójának szabályozásában, addig citoszolikus funkcióiról csak keveset tudunk, továbbá az eddigi eredmények is ellentmondásosak. Úgy tűnik, hogy az NLRC5 több jelátviteli útvonalat is szabályozhat, például a β -katenin, a transzformáló növekedési faktor (TGF) β és az Akt útvonalakba „beavatkozva” elősegítheti a tumorok képződését, továbbá szerepe felmerült még az NLRP3 inflammaszóma aktiváció szabályozásában is, illetve leírták, hogy az NF- κ B jelátvitelre és az I-es típusú IFN termelésre is hatással lehet [166]. Az NLRC5 szignál útvonalakat szabályozó szerepét lentebb taglaljuk.



8. ábra. Az NLRC5 és az NLRX1 szerkezete. Az NLRC5 egy atipikus CARD doménből, egy központi NOD/NACHT doménből, illetve egy C-terminális doménből áll, mely 27 leucin gazdag régiót (LRR) tartalmaz (A). A CARD és a centrális domén között pedig egy nukleáris lokalizációs szignál (NLS) található (A). Az NLRX1 C-terminálása 3 doménből áll, a C-terminális három hélix kötegből (CTHB), a leucin gazdag régióból (LRR) és az N-terminális helikális doménből (NTHD) (B). A fehérje közepén a NOD/NACHT domén, míg N-terminális végén a mitokondriális transzport szekvencia (MTS) található (B).

II.6.1.2 NLRX1, a mitokondrium-asszociált regulatórikus NLR

Az NLRX1 (más néven NOD5, NOD9, CLR11.3) az NLRC receptorok alszaládjába tartozó, minden szövetben expresszáldó, 975 aminosavból álló fehérje. Az NLRX1 nevében szereplő X a fehérje rejtélyes szerkezetére, pontosabban a nem teljesen jellemzett N-terminális doménjére utal. Az NLRC receptorok CARD doménje helyett csak egy domént azonosítottak a fehérje N-terminális végén, a mitokondriális transzport szekvenciát, mely egyedülálló módon képes a mitokondriális membránhoz lokalizálni az NLRX1-et (**8.B ábra**) [167]. A kezdeti kutatások arról számoltak be, hogy az NLRX1 a mitokondriumok külső membránjához kapcsolódik [155]. Később kimutatták, hogy az NLRX1 a belső mitokondriális membránhoz is kapcsolódhat, megtalálható a mátrixon belül, illetve a citoszólban is lokalizálódhat. Így feltételezhető, hogy más NLR-ekhez hasonlóan az NLRX1 is képes ingázni a különböző sejtkompartmentumok között, ami lehetővé teszi, hogy számos jelátviteli útvonallal kölcsönhatásba lépjen [149]. Az NLRX1 C-terminális doménje három szerkezeti egységből áll

[168]. Egy N-terminális helikális domén, egy központi hét LRR-t tartalmazó domén és egy C-terminális három-hélix köteg alkotja, mely elengedhetetlen a szerkezeti integritásához. Hong és munkatársai megállapították, hogy az NLRX1 közvetlenül képes kölcsönhatásba lépni az RNS ligandumokkal, de a DNS-sel nem, valószínűleg a C-terminális fragmentum pozitív töltésű felülete révén. Más NLR-ekhez hasonlóan az NLRX1 is tartalmaz egy központi NOD/NACHT domént [168] (**8.B ábra**).

Az NLRX1 lokalizációjától és interakciós partnereitől függően változatos funkciókkal rendelkezik. Az NLRX1 tartó fehérjeként képes részt venni nagy multifehérje-komplexek kialakításában [169]. Emellett dokumentálták, hogy az NLRX1 szabályozza az NF- κ B és az I-es típusú IFN jelátvitelt, befolyásolja a MAPK útvonalat, modulálja a ROS-termelést, valamint hatással van a főbb metabolikus útvonalakra, illetve az autofágiára és a sejthalálra is [148]. A gazdasejt-patogén interakciók szabályozása mellett az NLRX1 tumorszuppresszorként is működhet, vagy éppen ellenkezőleg, elősegítheti a metasztázisok kialakulását. Vizsgálatok szerint továbbá protektív szereppel bír és gátolja a különböző autoimmun betegségek, például az SLE, az SM és az IBD kialakulását és progresszióját. Az NLRX1 hozzájárulhat a metabolikus rendellenességek patogeneziséhez is [148,169,170]. Az NLRX1 sokrétű hatásait az magyarázhatja, hogy szabályozó szerepe erősen sejttípus specifikus lehet és a szabályozás jellemzőit az adott sejttípus egyedi funkcionális aktivitása vagy metabolikus profilja határozhatja meg. Az NLRX1 sejttípus specifikus hatásait munkacsoportunk foglalta össze [148]. Mivel az NLRX1 számos betegség kialakulásában szerepet játszik, az NLRX1-et megcélzó terápiák ígéretes kezelési stratégiákat kínálhatnak az immunsejt-, illetve a nem immunsejt-mediált betegségekben [170]. Az NLRX1 jelátviteli útvonalakat szabályozó szerepét lentebb részletezzük.

II.6.2 Inflammaszóma formáló NLR-ek

Az „inflammaszóma” kifejezés megalkotása Martinonhoz és munkatársaihoz köthető, ugyanis ők figyelték meg először ezen szupramolekuláris, kerékszerű struktúrák összeszerelődését az aktivált immunsejtek citoplazmájában [171]. Az endogén vagy exogén szignálok hatására összeszerelődő hetero-oligomer komplex alapja egy szenzor (például egy NLRP fehérje), melyhez az inflammaszóma típusától függően adaptor [például az apoptózis-asszociált speck-szerű, kaspáz aktivációs és toborzó domént tartalmazó fehérje (ASC)] és effektor fehérjék (kaspázok) kötődnek [172]. Az inflammaszómák aktiválása a pro-inflammatórikus kaspázok proteolitikus hasításához vezet. Az ily módon aktivált kaspázok ezután hasítják a szignál szekvencia nélküli pro-IL-1 β és pro-IL-18 pro-inflammatórikus

citokineket [173]. A feldolgozott, biológiailag aktív citokinek ezután rendhagyó módon szekretálódnak, a Golgi-ER útvonaltól függetlenül [174]. A szekretálódó IL-1 β és IL-18 gyulladásoos citokinek a későbbi szisztémás immunválaszt és gyulladási reakciókat mediálják [175].

Az NLR-ek közül az NLRP1, az NLRP3 és az NLRC4 képesek multimer fehérjekomplexeket képezni, aktivációs platformként szolgálva a kaszpáz-1 számára [172]. Számos más NLR-ről (NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP9b és NLRP12) is leírták már, hogy inflammaszóma-komplexeket képezhetnek [176–180], azonban *in vivo* csak az NLRP1, az NLRP3 és az NLRC4 szerepét jellemezték. Jelenleg még nem világos, hogy a többi NLR csupán „támogató” vagy más speciális szerepet tölt-e be a fentebb említett inflammaszóma összeszerelődése során.

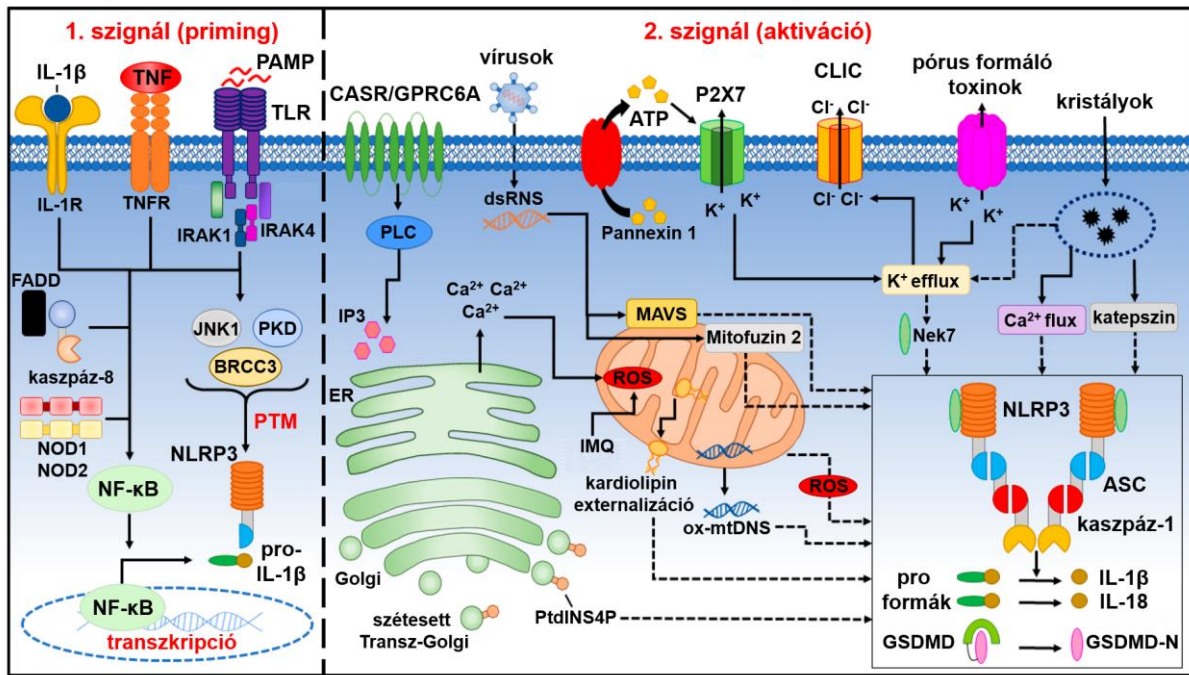
Az inflammaszóma formáló NLR-ek szerepét már széles körben tanulmányozták a monocitákban, a makrofágokban, a cDS-ekben, illetve más sejttípusokban [181–185]. Azonban az NLR-ek inflammaszóma formáló képességét még nem vizsgálták a pDS-ekben, mivel alacsony kaszpáz-1 kifejeződésük miatt nem feltételezték, hogy funkcióképes NLR inflammaszóma alakulhatnak ki bennük [186,187]. Eddig az inflammaszóma formáló receptorok közül csak az AIM2 citoszólikus DNS szenzorról írták le, hogy aktív a tumor-asszociált pDS-ekben [188]. Ez arra utalhat, hogy a pDS-ekben is összeállhatnak funkcionális inflammaszóma.

II.6.2.1 Az NLRP3 inflammaszóma

A kaszpáz-1-et aktiváló inflammaszóma között az NLRP3 a legjobban jellemzett. Az NLRP3 egy 118 kDa-os citoszólikus fehérje, melyet számos sejttípus, például a neutrofilek, makrofágok, mikroglia sejtek, limfociták, hámsejtek, oszteoblasztok, neuronok, DS-ek is kifejeznek [189]. Az NLRP3 fehérje tartalmaz egy N-terminális PYD domént, egy központi NACHT domént, mely az adenzin-trifoszfátáz (ATPáz) aktivitásán keresztül felelős az aktiváció indukált oligomerizációért [190], és egy C-terminális LRR-t, melynek funkciója még kérdéses [191].

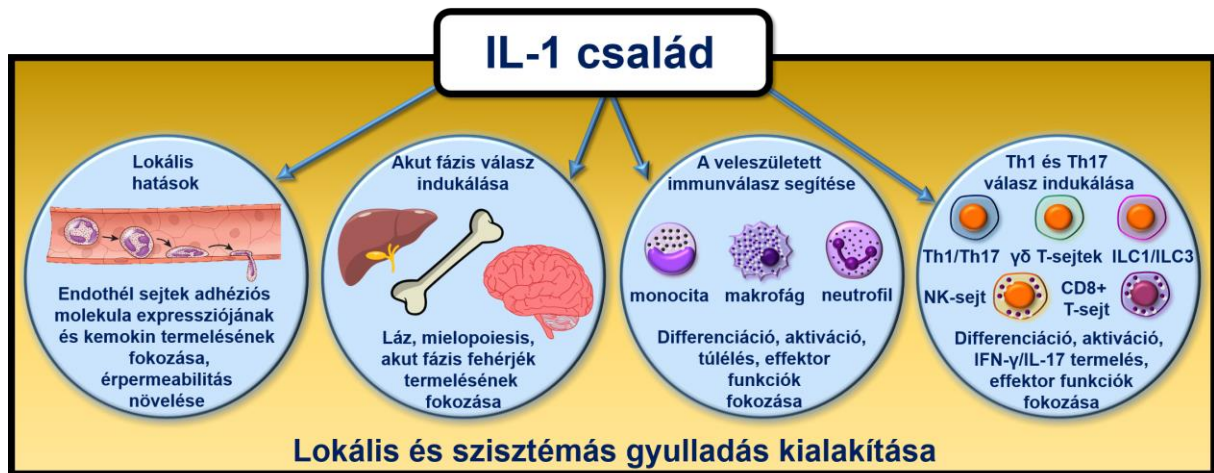
A kanonikus NLRP3 inflammaszóma aktiváció a legtöbb sejttípusban két lépésben valósul meg. Először az úgynevezett priming fázis során a citokin receptorok (például IL1R, TNFR) vagy más PRR-ek stimulálása (például TLR-ek, NOD2) aktiválja az NF- κ B és az aktivátor protein-1 útvonalakat, melyek transzkripció szinten fokozzák az NLRP3, a pro-IL-1 β és a pro-IL-18 expresszióját [146,192–194]. A legújabb kutatások szerint azonban a priming nemcsak a transzkripcióra hat, hanem az NLRP3 poszttranszlációs módosításait is szabályozza.

Például a fehérje c-Jun N-terminális kináz 1 mediált foszforilációja, illetve BRCA1/BRCA2-t tartalmazó komplex alegység 3 (BRCC3) (emberben BRCC36) közvetített deubikvitinációja esszenciális az inflammaszóma aktiválódásához [195] **(9. ábra)**. Ezt követően egy másodlagos stimulus hatására aktiválódik és oligomerizálódik az NLRP3. A legtöbb PRR-rel ellentétben az NLRP3-at rengeteg inger aktiválhatja. Ezek lehetnek endogén vagy exogén eredetű DAMP-ok, úgymint kristályos anyagok (például húgysavkristályok, szilícium-dioxid, azbeszt), extracelluláris adenzin-trifoszfát (ATP), hem, K^+ ionofórok, toxinok, valamint vírusokból, baktériumokból, gombákból és protozoonokból származó PAMP-ok [146,195,196] **(9. ábra)**. Jelenleg nem teljesen világos, hogyan képes az NLRP3 felismerni ilyen sokféle jelet. Feltételezhető, hogy az NLRP3 a változatos ingerek által kiváltott közös sejtszintű eseményt érzékeli és nem az egyedi stimulust. A stimulusok indukálhatják az ion áramok megváltozását (K^+ efflux, Ca^{2+} mobilizáció, Cl^- efflux, Na^+ influx), a mitokondrium diszfunkcióját és ROS képződést, illetve a lizoszómák sérülését [191]. Ezekről a folyamatokról már régóta ismert, hogy az NLRP3 aktivációjához vezethetnek. Chen és munkatársai nemrégén írták le, hogy a másodlagos stimulusok hatására a transz-Golgi hálózat „szétesik” (diszpergálódik) és a hálózat vezikulái szolgálnak az inflammaszóma aktivációjának állványzataként [197]. Ezután a NIMA-asszociált kináz 7 (NEK7), az NLRP3 inflammaszóma aktiváció és összeszerelődés alapvető szabályozója az NLRP3-hoz kötődik [198], ami lehetővé teszi az NLRP3 receptorok oligomerizálódását a NACHT doménjeiken keresztül, majd az ASC adaptor fehérje PYD-PYD kölcsönhatáson keresztül kapcsolódik az NLRP3-hoz, ami elősegíti a helikális ASC filamentum mag (ASC piroptoszóma) kialakulását. Ezt követően a CARD-CARD kölcsönhatáson keresztül az ASC összekapcsolódik a pro-kaspáz-1-gyel, mely indukálja az enzim autoproteolízisét. Az aktív kaspáz-1 ezután hasítja a pro-IL-1 β -t és a pro-IL-18-at, és így kialakul ezen fehérjék biológiailag aktív, érett formája [195,196]. A kaspáz-1 emellett hasítja és aktiválja a membrán pórusokat képző gazdermin D fehérjét is, melynek hatására elindul a piroptózisnak nevezett programozott sejthalál forma [199] **(9. ábra)**. A sejt ozmotikus potenciáljának károsodása a membrán pórusokon keresztül az intracelluláris tartalom, többek között az IL-1 β és az IL-18 gyulladáscsökkentő citokinek felszabadulásához vezet. Kevésbé erős aktivációs szignál hatására azonban az IL-1 β és az IL-18 szekretálódhat például mikrovezikulák, exoszómák, illetve szekretoros lizoszómák útján is a piroptózistól függetlenül [174,200].



9. ábra. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációja. A priming szignált mikrobiális komponensek vagy citokinek biztosítják, mely az NF-κB transzkripciós faktor aktiválásához, illetve az NLRP3 és pro-IL-1β expresszió fokozódásához vezet. Az NLRP3 poszttranszlációs módosításokon is keresztül megy, melyek „engedélyezik” az aktiválását. Az inflammaszómat különböző stimulusok, például extracelluláris ATP, pórusképző toxinok, vírusok és kristályos anyagok aktiválhatják. Az aktiválódáshoz az ionáramlás megváltozása, mitokondriális diszfunkció és ROS képződés, lizoszómális károsodás vagy a transz-Golgi hálózat szétesése szükséges [191]. BRCC3: BRCA1/BRCA2-t tartalmazó komplex alegység 3, CASR: kalcium érzékelő receptor, CLIC: klorid intracelluláris csatorna, FADD: FAS-asszociált halál domén protein, GPRC6A: G fehérjéhez kapcsolt receptorcsalád C csoport 6 szubtypus A, GSDMD: gazdermin D, IL-1R: IL-1β receptor, IMQ: imiquimod, IP3: inozitol-trifoszfát, IRAK: interleukin-1 receptor-asszociált kináz, JNK1: c-Jun N-terminális kináz 1, PKD: protein kináz D, PLC: foszfolipáz C, PtdINS4P: foszfatidil-inozitol 4-foszfát, PTM: poszttranszlációs módosítás, TLR: Toll-szerű receptor, TNFR: tumor nekrozis faktor receptor.

Az inflammaszóma aktiválódása során kialakuló érett IL-1 citokinek sokrétű hatásokkal rendelkeznek. Az IL-1β a klasszikus gyulladáskeltő, szisztémás akut fázis választ indukáló citokin [201,202]. A csontvelőben beindítja a mielopoiesist, továbbá a csontvelői HSC-ken és progenitor sejteken hatva „trained” immunitást is kialakít [201,203]. Lokálisan a szövetekben hatva aktiválja a kapillárisok endotélsejtjeit, többek között fokozza az adhéziós molekulák expresszióját, illetve kemokin termelésüket, mely az érfal megnövekedett átteresztőképességéhez vezet. Emellett fokozza a neutrofil granulociták, a monociták, a makrofágok antimikrobiális funkcióit, a túlélésüket, a pro-inflammatórikus citokin és kemokin termelésüket [201,204]. Az IL-18 a Th1 válasz motorja, mivel erőteljesen aktiválja az NK, az ILC1, a Th1 és a citotoxikus T-sejteket [201,204,205]. Az IL-1 citokinek a Th17 választ is támogatják, mivel elősegítik a Th17 sejtek polarizációját, citokin termelését, illetve fokozzák a γδ T-sejtek és az ILC3-sejtek effektor funkcióit is [201,204] (**10. ábra**).



10. ábra. Az IL-1 citokinek hatásai. Az IL-1 családba tartozó citokinek pleiotróp hatásokkal rendelkeznek, szisztémásan és lokálisan hatva a gyulladás kialakulásáért felelősek. NK: természetes ölősejt, Th: T helper, ILC: veleszületett limfoid sejt.

Tehát az aktiváció hatására felszabaduló IL-1 β és IL-18 citokinek erős gyulladást kiváltó hatásai központi szerepet játszanak az antibakteriális és az antifungális immunválaszokban [175,206,207]. Azonban az NLRP3 polimorfizmusai az NLRP3 inflammaszóma abnormális aktivációjához vezethetnek. A veleszületett immunsejtek fokozott IL-1 β és IL-18 szekréciója szisztémás gyulladást indukál, mely végül krónikus szövetkárosodásban és autoinflammatorikus betegségek kialakulásában teljesedik ki [208]. Az IL-1 β összekapcsolja az NLR útvonalat az adaptív immunválasszal is, ugyanis fokozhatja a B-sejtek proliferációját és antitest termelését, az autoreaktív Th1 és Th17 sejtek differenciálódását, illetve csökkentheti a regulátor T-sejtek szupresszor funkcióját [204]. Ezért nem meglepő, hogy számos autoimmun betegség, például az SLE, a psoriasis, az SM, a RA vagy az IBD is összefüggésbe hozható az NLRP3 inflammaszóma túlműködésével [209–212].

II.7 A citoszólikus szenzorok aktivitásának szabályozása

A sejtek citoszólikus receptorainak aktiválódása által közvetített effektor funkciók kiemelkedő jelentőséggel bírnak, mivel szükségesek a hatékony immunválaszhoz és a kórokozók eltávolításához. Ugyanakkor ezen receptorok túlfokozott, elnyújtott aktivációja szövetkárosodáshoz és különféle patológiás állapotok kialakulásához vezethet. Így tekintettel az aktivációjukat kiváltó stimulusok sokféleségére, valamint az expozíció módjának és időtartamának változatosságára, az immunrendszernek „minőségileg és mennyiségileg” eltérő gyulladásos válaszokat kell létrehoznia, melyeket finomhangolni is szükséges az optimális

válasz elérése érdekében. Ezért a citoszólikus receptorok aktivitását számos mechanizmus szabályozza, mely lehet pozitív vagy negatív reguláló mechanizmus is. A RIG-I TRIM25 vagy Riplet mediált K63-kapcsolt poliubikvitinációja például kulcsfontosságú a receptor aktivációjához [144]. Ezzel ellentétben nemrégén írták le, hogy a TRIM29 molekula negatívan szabályozza a RIG-I útvonalat [213, 214]. A PKR protein aktivátor dsRNS-kötő fehérje pedig a RIG-I C-terminális doménjével lép kölcsönhatásba, és serkenti ATPáz aktivitását, míg az MDA5 esetén a receptor oligomerizációját fokozza. A 14-3-3 fehérjecsald tagjai pedig az RLR-ek citoszól-mitochondrium transzlokációs lépéséhez kulcsfontosságúak. A hosszú nem kódoló RNS-ekről, illetve a mikroRNS-ekről is ismert, hogy elősegítik vagy éppen ellenkezőleg, gátolják az RLR jelátvitelt. Az autófágiáról is leírták már, hogy több ponton gátolhatja az RLR szignalizációt [144].

Munkacsoportunk régóta vizsgálja az RLR aktiváció finomhangolásának lehetséges mechanizmusait humán DS-ekben. Leírtuk, hogy a mitokondriális ROS jelentősen fokozza a pDS-ek RIG-I mediált I-es típusú IFN termelését a MAVS expresszió, illetve az Akt és az IRF3 foszforiláció fokozásán keresztül [215]. Emellett kimutattuk, hogy az oxidatív foszforiláció is elengedhetetlen a RIG-I agonistával kezelt pDS-ekben az IFN termeléshez [112]. Igazoltuk továbbá, hogy az emlős rapamycin célpont aktivitás szintén szükséges a moDS-ek és a pDS-ek RLR-indukált antivirális és gyulladásozó válaszához, mivel elengedhetetlen a TBK1 foszforilációjához [216]. A regulatórikus NLR-ek szerepe azonban még nem feltárt a DS-ek RLR-közvetített immunválaszában.

Kutatásunk során ezért egyrészt a citoszólikus szenzorok receptor-receptor kölcsönhatásokon alapuló, másrészt a receptor aktivitás következtében termelődő citokin válaszok interakcióin alapuló szabályozó mechanizmusokat is vizsgáltuk humán DS-ekben.

II.7.1 Receptor-receptor kölcsönhatásokon alapuló szabályozás

II.7.1.1 Az NLRC5 szerepe az RLR-közvetített immunválasz szabályozásában

Az NLRC5 hatással lehet a veleszületett és az adaptív immunválaszokra is, bár az eddigi eredmények látszólag ellentmondásosak. Leírták, hogy az NLRC5 az I-es típusú IFN válasz pozitív szabályozója lehet vírusfertőzések során, ugyanis kimutatták, hogy az NLRC5 kis interferáló (si)RNS-sel történő csendesítése károsítja az IFN- α expressziót CMV fertőzést követően humán fibroblasztokban [164]. Hasonló eredményekről számolt be egy másik munkacsoport is, ugyanis vizsgálatukban az NLRC5 hiánya csökkentette a Sendai vírus és a polyinozin:polycitidilsav (polyI:C) indukált I-es típusú IFN választ THP1 sejtekben és humán primer dermális fibroblasztokban [217]. Ranjan és kollégái pedig az NLRC5-öt

overexpresszáló humán légúti epitél sejtekben mutatták ki, hogy az NLRC5 a RIG-I-hez kötődve fokozott IFN- β szekréciót és az influenza vírus csökkent replikációját eredményezte [218].

Ezzel szemben egy másik kutatócsoport kimutatta, hogy az NLRC5 közvetlen kölcsönhatásba lépve az IKK-val és a RIG-I-gyel negatívan szabályozza az NF- κ B és az I-es típusú IFN útvonalakat különböző sejtvonalakban és primer sejtekben egyaránt [153]. Ugyanis vírusfertőzést vagy a specifikus agonisták általi stimulációt követően a RIG-I és az MDA5 CARD doménje hozzáférhetővé válik az NLRC5 számára, az NLRC5 pedig a MAVS-sal verseng a kötődésért, ami az IRF3 aktivációjának gátlásához vezet [153]. Ugyanez a munkacsoport kimutatta, hogy az NLRC5 hiányos egerekből származó embrionális fibroblasztokban, peritoneális és csontvelő eredetű makrofágokban fokozódik az IL-6 és az IFN- β termelés vezikuláris stomatitis vírus (VSV) fertőzést vagy LPS stimulációt követően, míg a csontvelő eredetű DS-ekre nincs hatással az NLRC5 hiánya [154]. Érdekes módon Kumar és munkatársai szerint az NLRC5 nem játszik szerepet a citokin indukcióban sem a csontvelő eredetű makrofágokban, sem a DS-ekben a virális és a bakteriális fertőzésekre adott válasz során [219]. Továbbá kimutatták, hogy az NLRC5 közvetlenül kötődhet a TBK1-hez is és gátolja a TBK1 közvetített IFN- β promóter aktivációt HEK293T sejtekben [219].

Összességében az *in vitro* adatok határozottan arra utalnak, hogy az NLRC5 a citoszólban a RIG-I-gyel [153,218], az MDA5-tel [153] és a TBK1-gyel [219] történő kölcsönhatáson keresztül szabályozhatja az I-es típusú IFN-választ. A pozitív és negatív hatások közötti ellentmondást a különböző sejtípusok és egérmmodellek, illetve az overexpressziós vagy a génulláció technikák alkalmazása magyarázhatja.

II.7.1.2 Az NLRX1 szerepe az RLR-közvetített immunválasz szabályozásában

Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az NLR-család tagjai kulcsszerepet játszanak az antivirális immunválaszokban. Moore és munkatársai HeLa és HEK293T sejteket használó *in vitro* rendszerükben elegánsan bizonyították, hogy az NLRX1 a RIG-I és valószínűleg az MDA5 indukált antivirális jelátvitel negatív szabályozója, mivel verseng ezen receptorokkal a MAVS CARD doménjének megkötéséért [155]. Továbbá *in vivo* körülmények között Allen és munkatársai bizonyították az NLRX1 negatív szabályozó szerepét a vírus indukált gyulladásban is az influenzafertőzés egérmmodelljében. Eredményeik alapján az NLRX1 hiányos egerek habár gyorsabban eliminálták a vírust, fokozott IL-6 és IFN- β szinttel, súlyosabb tüdőkárosodással és morbiditással voltak jellemezhetőek [156].

A MAVS megkötéséért történő közvetlen versengésen kívül az NLRX1 közvetett módon is gátolhatja a RIG-I-MAVS szignalizációt. Egy humán hepatóma sejtvonalon kimutatták, hogy az NLRX1 nukleotidkötő doménje a hepatitis C vírus indukált RIG-I-MAVS szignalizációt a poli(rC) kötőfehérje 2 (PCBP2) MAVS-hez történő toborzásával gátolja. A PCBP2 indukálja a MAVS K48-kapcsolt poliubikvitinációját és ezt követő proteasomális degradációját, így korlátozza az I-es típusú IFN termelést [220]. Továbbá az NLRX1-et számos más vírus is felhasználhatja a gazdaszervezet antivirális válaszána modulálására, és így a vírus replikációjának és túlélésének elősegítésére. Például Rhesus majmokban a simian immunhiány vírus a fertőzés kezdetén NLRX1 expressziót indukál, hogy elősegítse saját replikációját [221]. Azt is kimutatták, hogy a súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus 2 ORF9c fehérjéje kölcsönhatásba léphet az NLRX1-gyel, amelyen keresztül befolyásolhatja a MAVS által közvetített I-es típusú IFN és pro-inflammatórikus citokin szekréciót [222].

Ezzel szemben egy másik munkacsoport arról számolt be, hogy az NLRX1 hiánya nem befolyásolja az RLR szignalizációt [157]. Egy másik vizsgálatban szintén nem volt hatással az NLRX1 hiánya az antivirális és a gyulladásos válaszokra az NLRX1 hiányos egerekből származó csontvelő eredetű makrofágokban és egér embrionális fibroblasztokban Sendai vírus fertőzését követően [158]. Továbbá egy harmadik vizsgálat is arról számolt be, hogy az NLRX1 csendesített HEK293T sejtek Sendai vírus expozíciót követően normális I-es típusú IFN válasszal voltak jellemezhetőek [159].

Ezen korábbi eredmények egyértelműen jelzik, hogy az NLRX1 által közvetített szabályozás módja az antivirális válaszokban sejttípus specifikus, illetve az adott vírus jellemzői határozzák meg, melyek közvetlenül vagy közvetve módosíthatják az NLRX1 működését. Az antivirális immunválasz negatív szabályozásával az NLRX1 nemcsak a gazdaszervezetet teheti fogékonyá a vírusfertőzésekre, hanem elősegítheti a vírus-indukált tumorok (Kaposi-sarcoma vagy primer effúziós limfóma) kialakulását is [223]. Másrészt a tartósan magas I-es típusú IFN szekréció potenciálisan autoimmun folyamatokat elősegítő hatásai miatt az antivirális immunválaszt szigorúan kontrollálni kell. Az eddigi kutatási eredmények alapján úgy tűnik, hogy az NLRX1 részben felelős lehet azért, hogy szabályozó szerepe révén ezt a kényes egyensúlyt fenntartsa [148].

II.7.2 Receptor aktivitást követő citokin válaszok interakcióin alapuló szabályozás

Mivel az IL-1 család citokinjei rendkívül erőteljes hatásúak, ezért termelődésük és szekréciójuk szabályozására több szinten is reguláló mechanizmusok „épültek be a rendszerbe”. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációját számos mechanizmus, többek között citokinek és

fehérje interakciók is szabályozhatják. Az I-es típusú IFN-ok krónikus vírusos és bakteriális fertőzésekben immunszuppresszív tulajdonsággal bírnak [224]. Emiatt „gyulladásgátlóként” is alkalmazzák őket, például az SM kezelésében [225]. A legfontosabb mechanizmus, melyen keresztül az IFN-ok kifejtik immunszuppresszív hatásukat, az inflammaszóma-IL-1 β tengely gátlása.

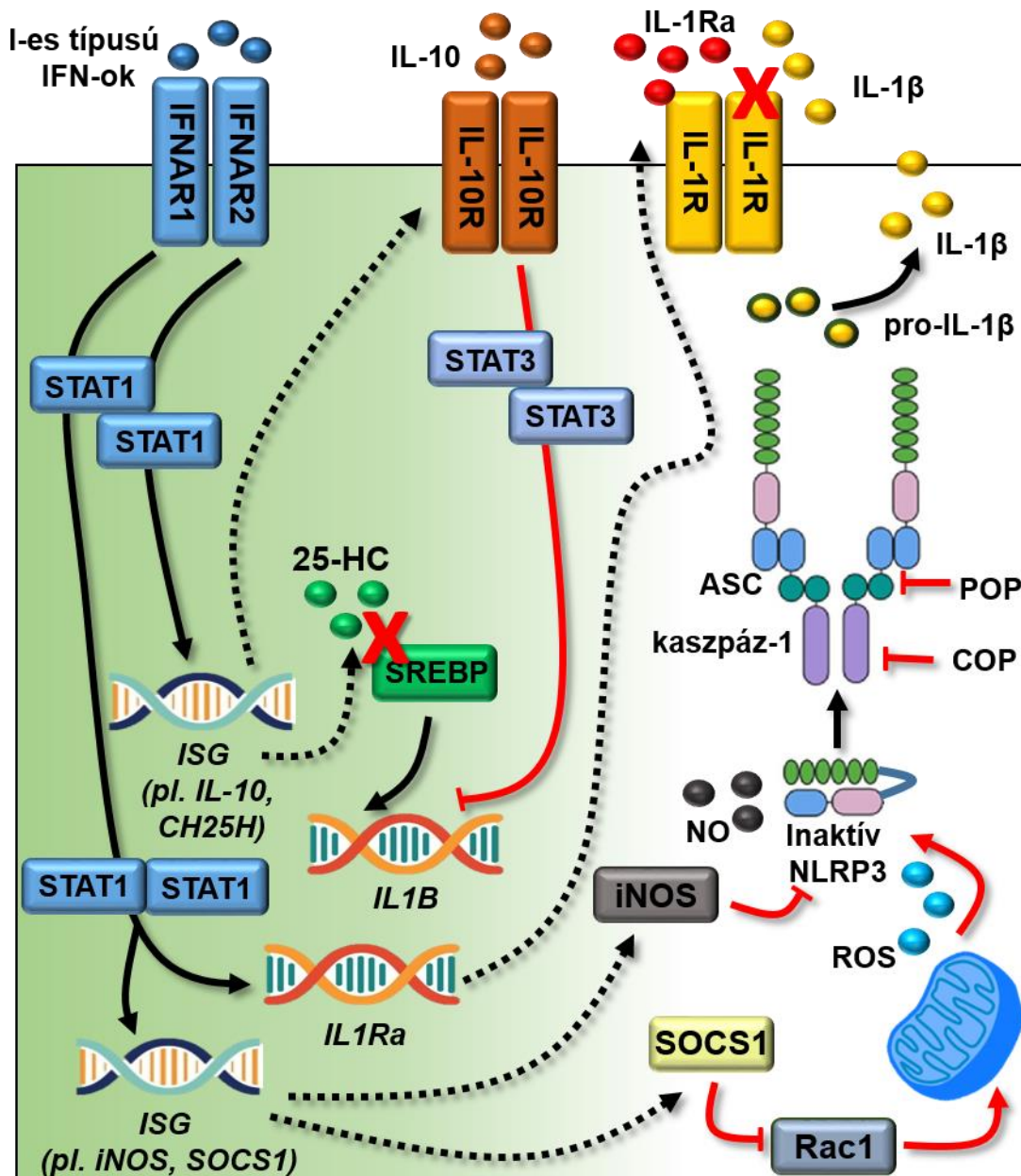
Az I-es típusú IFN-ok közvetlenül gátolhatják az IL-1 jelátvitelt az IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) expressziójának indukálásával [226], továbbá transzkripció jelátalakító és aktiváló (STAT)1-függő módon csökkentik az IL-1 β szekréciót is [227]. A gátlás mechanizmusát tekintve az IFN- β először indukálja az IL-10 expresszióját, mely pleiotróp immunszuppresszív hatással rendelkezik. Az IFN- β indukált IL-10 ezután az IL-10 receptorhoz (IL-10R) kötődik, mely aktiválja a STAT3 jelátvitelt és gátolja a pro-IL-1 α és a pro-IL-1 β mRNS expressziót [227]. Az IFN- β indukálja egy másik interferon indukálható gén, a koleszterol 25-hidroxiláz (CH25H) expresszióját is. Ez a gén egy enzimet kódol, mely a koleszterolt 25-hidroxikoleszterollá (25-HC), egy antivirális tulajdonságokkal bíró lipiddé alakítja. A 25-HC a szterol szabályozó elemet kötő fehérje (SREBP) ligandja, és gátolja a SREBP aktivitását, ami szükséges az IL-1 β transzkripció indukációjához [228]. Továbbá az IFN-ok serkentik az indukálható nitrogén-oxid-szintáz (iNOS) expresszióját is. A termelődő nitrogén-monoxid pedig nitrolizálja az NLRP3-at, ami megakadályozza az NLRP3 oligomerizációját [229,230]. Az IFN- β a ROS-termelés gátlásával is képes gátolni az NLRP3 aktiválódását. Makrofágokban az IFN- β a citokin jelátvitel szuppresszor 1 (SOCS1) expresszióját indukálja, ami gátolja a Rac1-mediált ROS-generációt, mely az NLRP3 aktiválódásához lenne szükséges [231] **(11. ábra)**.

Az inflammaszóma-komplexet alkotó fehérjék mellett más proteinek is kölcsönhatásba léphetnek az NLRP3-mal. A csak pirin fehérjék (POP-ok) és a csak CARD fehérjék (COP-ok) olyan kis citoplazmatikus „csapda” fehérjék, melyek egyetlen homotípusos fehérje kötő domént tartalmaznak és fő funkciójuk a gyulladás szabályozása [232]. A négy POP (POP1-POP4) közül a POP1 és a POP2 szabályozza az NLRP3 aktiválódását is, ugyanis az ASC-hez kötődve gátolják az NLRP3-ASC kölcsönhatást [232,233]. Az öt humán COP ezzel szemben a kaszpáz-1 aktivációt szabályozza. Közülük három, a COP1 (CARD16), az ICEBERG (CARD18) és az INCA (CARD17) képes a teljes hosszúságú kaszpáz-1-hez kötődni, ezáltal megakadályozva annak autoproteolízisét, így korlátozva az inflammaszóma aktiválódását [232] **(11. ábra)**.

Érdekes módon az IL-1 is képes gátolni az IFN út vonalat. Hepatocitákban megfigyelték, hogy az IL-1 β képes az IFN α/β indukált STAT1 foszforilációt gátolni egy proteaszóma-függő mechanizmuson keresztül [234]. Egy másik tanulmány is leírta az IFN- β termelés IL-1-függő

gátlását humán fibroblasztokban [235]. A gátlás hátterében a prosztoglandin E2 (PGE2) állhat. A tuberkulózis fertőzés vizsgálata során derült ki, hogy az IL-1 antagonizálja az I-es típusú IFN-választ, mivel a PGE2 indukcióján keresztül közvetlenül szabályozza az IFN- β transzkripcióját és translációját [236]. Tehát elmondható, hogy az I-es típusú IFN és az NLRP3-függő IL-1 β útvonalak között kölcsönös negatív kölcsönhatás állhat fenn.

Így munkánk során amellet, hogy a humán pDS-ek citoszólikus receptorainak expressziós profilját és ezen receptorok szabályozó mechanizmusait kívántuk feltárni, kíváncsiak voltunk arra is, hogy vajon a professzionális I-es típusú IFN termelő sejtekben, azaz a pDS-ekben működőképes lehet-e egyáltalán az NLRP3 útvonal és ha igen, akkor milyen feltételek szükségesek az aktivációjához, illetve milyen interakciók lehetnek az I-es típusú IFN és az NLRP3-függő IL-1 β útvonalak között, melyet ezen sejtek esetében még nem vizsgáltak.



11. ábra. Az I-es típusú IFN-ok IL-1 β útvonalat gátló mechanizmusai. Az I-es típus IFN-ok számos negatív reguláló molekula expressziójának fokozásával gátolják az NLRP3-függő IL-1 β útvonalat. Többek között indukálják különféle ISG-k (IL-10, CH25H, iNOS, SOCS1) expresszióját, valamint fokozzák az IL-1Ra, a POP és a COP expressziót is. IFNAR: interferon- α/β receptor, IL-10R: interleukin-10 receptor, IL-1R: interleukin-1 receptor, IL-1Ra: interleukin-1 receptor antagonist, 25-HC: 25-hidroxi-koleszterol, CH25H: koleszterol 25-hidroxiláz, ISG: interferon stimulált gén, iNOS: indukálható nitrogén-oxid-szintáz, NO: nitrogén-monoxid, Rac1: Ras-kapcsolt C3 botulinum toxin szubsztrát 1, SOCS1: citokin jelátviteli szupresszor 1, SREBP: szterol szabályozó elemet kötő fehérje, STAT: transzkripció jelátalakító és aktiváló. Az ábra Labzin és kollégái munkája nyomán készült [237].

III. Célkitűzések

Vizsgálataink során a citoszólikus, reglatórikus NLR-ek expressziós mintázatát, illetve az RLR jelátviteli útvonal szabályozásában betöltött funkciójukat kívántuk tanulmányozni a humán pDS-ekben a moDS-ekkel összehasonlításban, *in vitro* modell rendszerekben. Továbbá munkánk során az inflammaszóma-formáló NLR-ek közül az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásának feltételeit és az I-es típusú IFN-ok általi szabályozását is fel kívántuk tárni a humán pDS-ekben. Kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

I/1 A humán pDS-ek és moDS-ek milyen alapszintű, illetve aktiváció-indukált NLRX1 és NLRC5 expresszióval jellemezhetők?

I/2 Hogyan hat az NLRX1 és az NLRC5 csendesítése a pDS-ek és a moDS-ek RLR-indukált antivirális és gyulladásszerű válaszára?

II/1 Milyen az NLRP3 inflammaszóma komponensek alapszintű expressziója humán pDS-ekben és ezt hogyan befolyásolják a különböző aktivációs szignálok?

II/2 Milyen másodlagos szignálok szükségesek az inflammaszóma aktiválódásához pDS-ekben?

II/3 Milyen kölcsönhatások állnak fenn az I-es típusú IFN útvonal és az NLRP3-függő IL-1 β szekréciós útvonal között pDS-ekben?

IV. Anyagok és módszerek

IV.1 Sejtvonalak és sejtenyésztési körülmények

A kísérleteinkhez használt humán pDS sejtvonalat (GEN2.2) [133] Dr. Joel Plumas és Dr. Laurence Chaperot (Research and Development Laboratory, French Blood Bank Rhône-Alpes, Grenoble, Franciaország, CNCMI szám: 2938) bocsátotta rendelkezésünkre. A GEN2.2 sejteket mitomycin C-vel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kezelt MS5 egér feeder sztróma sejteken (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Németország, kat. sz. ACC 441) RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük. A médium ki volt egészítve 10% hő inaktivált fetális szarvasmarha szérummal (FBS, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel (mindkettő Biosera, Nuaille, Franciaország) és 5% nem esszenciális aminosavval (Life Technologies). A kísérletekhez a GEN2.2 sejteket eltávolítottuk a feeder sejtrétegről és 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre osztottuk szét őket 5×10^5 sejt/500 µl koncentrációban teljes RPMI 1640 médiumban. A sejt kultúrákat termosztátban tartottuk 37 °C-on, 5% CO₂ szaturáció mellett. A GEN2.2 és az MS5 sejtvonalak esetén a Mycoplasma kontaminációt MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit-tel (Lonza, Bázél, Svájc) zártuk ki, a sejtenyészeteket havonta egyszer ellenőriztük.

A VSV vírus szaporításához afrikai zöld majom vese epiteliális Vero sejtvonalat (ATCC-CCL-81, Manassas, VA, USA) használtunk. A Vero sejteket Dulbecco's modified Eagle's minimal essential médiumban (DMEM, Sigma-Aldrich) tenyésztettük, melyet 10% hő inaktivált FBS-sel, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel egészítettünk ki. A sejt vonal tenyésztését és az inkubációkat 37°C-os termosztátban végeztük, 5% CO₂ szaturáció mellett. A Vero sejt vonal esetén a Mycoplasma kontaminációt szintén MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit-tel ellenőriztük a gyártó utasításainak megfelelően.

IV.2 Humán perifériás vérminták gyűjtése és feldolgozása

A psoriasisos betegek vérmintáit a Regeneratív Medicina és Celluláris Farmakológiai Kutató Laboratórium (Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika) bocsátotta rendelkezésünkre. A humán vérminták gyűjtése megfelelt a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek, melyet az Országos Tisztifőorvosi Hivatal, illetve az Egészségügyi Tudományos Tanács engedélyezett (adminisztratív szám: 13740-5/2021/EÜIG és 4969; 90/2021-SZTE IKEB, protokoll kód: PSO-CELL-01).

A vizsgálatba 25 és 65 év közötti, plakk típusú psoriasisban szenvedő férfiakat vagy nőket vontunk be, akiknek a psoriasis kiterjedési és súlyossági indexe nagyobb volt, mint 15. Kizártuk azokat a betegeket, akik szisztémás (biológiai vagy hagyományos) kezelésben vagy teljes testre kiterjedő fényterápiában részesültek. A psoriasisos mintákkal végzett kísérletekhez egészséges, nemben és életkorban illeszkedő (40-55 éves) donorok perifériás vérért használtuk kontrollként. Az NLRP3 útvonal karakterizálására egészséges 23-55 éves önkénteseket választottunk ki perifériás vér adására.

A psoriasisos és az egészséges donoroktól 25 ml perifériás vért gyűjtöttünk 10 ml-es porlasztott K₂EDTA-t tartalmazó lila kupakos BD Vacutainer® csövekbe (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A vért 1:1 arányban hígítottuk fiziológiás sóoldattal (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen, Németország), majd a PBMC-eket Ficoll Paque Plus (Cytiva Sweden AB, Uppsala, Svédország) gradiens centrifugálással választottuk el. A frissen izolált PBMC-eket felvettük RPMI 1640 médiumba, mely 10% hő inaktivált FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel volt kiegészítve. A kísérletekhez a sejteket fluoreszcencia-aktivált sejt elválasztás (FACS) csövekbe pipettáztuk 1×10^6 sejt/500 µl médium koncentrációban.

IV.3 Primer sejtek izolálása és differenciáltatása

A primer sejteket humán heparinos buffy coat készítményekből izoláltuk, melyek egészséges véradóktól származtak, a véradás az Országos Vérellátó Szolgálat Regionális Vérellátó Központjában (Debrecen, Magyarország) történt. A vérkészítmények használatát az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója és a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Regionális és Intézeti Etikai Bizottsága (Debrecen, Magyarország) hagyta jóvá. A vért 1:1 arányban hígítottuk fiziológiás sóoldattal (NaCl 0,9%), majd a PBMC réteg elválasztásához Ficoll Paque Plus gradiens centrifugálást alkalmaztunk.

A primer humán pDS-eket pozitív szelekciót alkalmazva izoláltuk a PBMC-ből a humán CD304 (BDCA4/Neuropilin-1) MicroBead Kit (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Németország) segítségével. A mágneses szeparálás után az izolált pDS populáció tisztaságát (>98%) áramlási citometriával erősítettük meg. Az RPMI 1640 tápfolyadékban felvett sejteket ezután 48 lyukú sejtenyésző lemezekre osztottuk szét 5×10^5 sejt/500 µl sűrűségben. Az RPMI 1640 médium 10% hővel inaktivált FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, 100 µg/ml streptomycint és 50 ng/ml rekombináns humán IL-3-at (Peprotech EC, Brüsszel, Belgium) tartalmazott. A sejteket 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ szaturáció mellett inkubáltuk.

A primer humán makrofágok differenciáltságához a monocitákat pozitív szelekcióval nyertük ki a PBMC rétegből anti-CD14-konjugált mikrogyöngyök (Miltenyi Biotech) segítségével. A mágneses szeparálás után az izolált monocita populáció tisztaságát (>98%) áramlási citometriával erősítettük meg. A monocitákat 24 lyukú sejtenyésző lemezekre osztottuk szét 5×10^5 sejt/500 μ l sűrűségben RPMI 1640 tápfolyadékban. A médiumot 10% hő inaktivált FBS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 U/ml penicillinnel, 100 μ g/ml streptomycinnel és 50 ng/ml rekombináns humán makrofág kolónia stimuláló faktorról (M-CSF, Peprotech) egészítettük ki. A differenciáltság második napján a médium felét lecseréltük és ismét M-CSF-et adtunk a sejtekhez. A sejteket 5 napig differenciáltattuk, majd a makrofágokat 250 ng/ml Ultrapure LPS-sel (E. coli 0111:B4, InvivoGen, San Diego, CA, USA) aktiváltuk a kísérletekben megjelölt időpontokig. A sejteket 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ szaturáció mellett inkubáltuk.

A moDS-ek differenciáltságához a frissen izolált monocitákat 24 lyukú sejtenyésző lemezre pipettáztuk 10⁶ sejt/ml sűrűségben RPMI 1640 tápfolyadékban. A médium 10% hő inaktivált FBS-t, 2 mM L-glutamint, 100 U/ml penicillint, 100 μ g/ml streptomycint, 80 ng/ml GM-CSF-t (Gentaur Molecular Products, London, UK) és 50 ng/ml IL-4-et (PeproTech) tartalmazott. A második napon a tápfolyadék felét lecseréltük és ismét GM-CSF-et és IL-4-et adtunk a sejtekhez friss RPMI 1640 médiumban. A sejteket 5 napig 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ szaturáció mellett inkubáltuk.

IV.4 Géncsendesítési kísérletek

A GEN2.2 sejteket vagy a frissen izolált monocitákat kezeletlenül hagytuk (kontroll), kis interferáló RNS-sel (siRNS) nélkül elektroporáltuk (mock), NLRX1- (Assay ID: s36063, Life Technologies) vagy NLRC5- (Assay ID: s38591, Life Technologies) specifikus Silencer Select validált siRNS-ekkel vagy Silencer Select negatív kontroll siRNS-sel (scr, Life Technologies) transzfektáltuk Opti-MEM médiumban (Life Technologies) 4 mm-es küvetákban (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Németország) GenePulser Xcell eszköz (Bio-Rad) segítségével. A transzfekciót követően a sejteket a korábban leírtak szerint osztottuk szét a sejtenyésző lemezekre aktivációhoz vagy differenciációhoz.

IV.5 A VSV vírus szaporítása és a vírustiter meghatározása

A VSV vírust (Indiana szerotípus) Dr. Csoma Eszter (Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. A vírust 36 órán keresztül 37°C-on szaporítottuk a Vero sejtvonalban. A fertőzött sejtenyészetek

felülúszóját leszívtuk és az ép sejteket vagy a sejtörmeléket centrifugálással (1000×g, 10 perc, 4°C) távolítottuk el. Ezután a felülúszókat 0,45 µm-es steril fecskendőszűrővel (Rephile, Bioscience Ltd., Shanghai, Kína) átszűrtük, majd a vírusos felülúszókat Amicon Ultra-15 100K centrifugális szűrőegységbe (Millipore, Danvers, MA, USA) helyeztük és lecentrifugáltuk (4000×g, 20 perc, 4°C). A koncentrált vírust aliquot-okban -80°C-on tároltuk, és később ezeket a szuszpenziókat használtuk a sejtek megfertőzéséhez.

A VSV szuszpenzió vírustiterének meghatározására plakk assay-t végeztünk. A Vero sejteket 12 lyukú szövettenyésztő lemezekre osztottuk szét és a sejtek konfluens monorétegét a VSV állomány 10-szeres sorozatos hígításával oltottuk be, majd a sejteket 1 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, ezután pedig 0,3%-os agaróz (Sigma-Aldrich) tartalmú DMEM-et pipettáztunk a monorétegre. A DMEM 2% hő inaktivált FBS-t, 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazott. Ezután a sejteket 2 napig 37°C-on inkubáltuk, majd 4%-os formaldehiddel (Sigma-Aldrich) szobahőmérsékleten 1 óráig fixáltuk őket, a fixálás után pedig az agaróz réteget eltávolítottuk. A plakk képződés láthatóvá tételéhez 0,2%-os kristályviola (Sigma-Aldrich) oldatot pipettáztunk a lyukakba, melyet 5 perc inkubáció követett. A lemezeket mostuk és szárítottuk, majd kiszámítottuk a milliliterenkénti plakk képző egységek számát.

A humán DS-ek VSV fertőzéséhez a vírus szuszpenziót a megadott fertőzés multiplicitásra (MOI) hígítottuk, majd a sejteket 18 vagy 24 óráig inkubáltuk a vírussal.

IV.6 Az *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Candida albicans* tenyésztése és a csíraszám meghatározása

A mikrobákat Dr. Pfliegler Valter Péter (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. Az *Escherichia coli*-t (*E. coli*, ATCC 11775) és a *Bacillus subtilis*-t (ATCC6051) LB agaron, a *Lactobacillus rhamnosus*-t (ATCC53103) MRSA táptalajon, a *Candida albicans*-t (ATCC10231) pedig YPD agaron tenyésztettük. Miután hígítási sort készítettünk a sejtsuszpenzióból, a sejtsuszpenziók koncentrációját Thomakamrában való számolással 1000-szeres nagyítás alatt végeztük, a *Candida albicans* esetén pedig 400-szoros nagyítással.

A humán pDS-ek fertőzéséhez a mikroba szuszpenziókat a megadott MOI-ra hígítottuk, majd a sejteket 3 vagy 6 óráig inkubáltuk a mikrobákkal.

IV.7 A sejtek kezelése

A RIG-I expresszió indukálásához a GEN2.2 sejteket 0,25 μM CpG-A-val (ODN 2216, Hycult Biotech, Uden, Hollandia) inkubáltuk 16 órán keresztül. Ezt követően a sejteket mostuk, újra szétosztottuk őket 24 lyukú lemezekre friss, teljes RPMI 1640 tápfolyadékban, majd 5'ppp-dsRNS-sel (InvivoGen), a RIG-I specifikus agonistájával vagy nagy molekulású polyI:C-val (InvivoGen), a RIG-I/MDA5 agonistájával kezeltük a sejteket LyoVecTM transzfecció reagens (InvivoGen) felhasználásával a gyártó ajánlásainak megfelelően. A primer pDS-ek esetén a RIG-I indukációjához a sejteket 2,5 μM CpG-A-val kezeltük 16 órán keresztül a western blot analízis előtt. A moDS-ek esetében a tápfolyadék felét leszívtuk, friss tápfolyadékkal helyettesítettük, majd az 5'ppp-dsRNS/LyoVecTM vagy a nagy molekulású polyI:C/LyoVecTM komplexszel történő stimulációt a GEN2.2 sejteknél leírtak szerint végeztük. A vírusfertőzés modellezéséhez a kezeletlen és a CpG-A-val előkezelt GEN2.2 sejteket és moDS-eket élő VSV-vel (MOI 1 és MOI 10) fertőztük 18, illetve 24 órán keresztül.

Az NLRP3 inflammaszóma aktiválásához a GEN2.2 sejteket 1 μM CpG-A-val, 1 μM CpG-B-vel (ODN 2006, Hycult Biotech) vagy 5 $\mu\text{g/ml}$ Imiquimoddal (InvivoGen) kezeltük friss, teljes RPMI 1640 médiumban a megadott ideig. Az inflammaszóma aktiválásához másodlagos szignálként többek között 20 μM nigericint (InvivoGen), 5 mM ATP-t (InvivoGen), 250 $\mu\text{g/ml}$ alumínium-hidroxidot (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA), 300 $\mu\text{g/ml}$ mononátrium-urátot (MSU, Sigma-Aldrich) vagy 0,5 $\mu\text{g/ml}$ antimycin A-t (AMA, Sigma-Aldrich) adtunk a sejtekhez a primingot követően mosási lépés nélkül, majd a sejteket 1, 2, 4 vagy 6 órán át inkubáltuk.

Külön kísérletekben a GEN2.2 sejteket *E. coli* ATCC 11775, *Bacillus subtilis* ATCC6051, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103, *Candida albicans* ATCC10231, VSV (Indiana szerotípus) vagy HSV 1 (KOS szerotípus, ATCC-VR-1493) mikróbákkal kezeltük. A baktériumok és a vírusok esetében 10-es MOI-t, míg a *Candida albicans* esetében 0,01-es MOI-t alkalmaztunk. A baktériumokat és a *Candida albicans*-t Dr. Pfliegler Valter Péter (Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen, Magyarország) bocsátotta rendelkezésünkre. A vírusokat Dr. Csoma Esztertől (Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen, Magyarország) kaptuk. A mikrobiális priming után a sejteket 20 μM nigericinnel (InvivoGen) inkubáltuk a megadott időpontig. Egyes kísérletekben a sejteket az *E. coli* és a nigericin (InvivoGen) kezelés előtt 3 órával VSV-vel vagy HSV-vel (MOI 10) kezeltük elő.

Párhuzamos kísérletekben 1 μ M MCC950-et (Invivogen) vagy 20 μ M Z-YVAD-FMK-t (BioVision Incorporated, Milpitas, CA, USA) adtunk a sejtekhez a priming utolsó 30 percére, majd a sejteket mosási lépés nélkül kezeltük a másodlagos szignállal.

A CpG-B-vel végzett kísérleteket 50 μ g/ml rekombináns humán IFN- α (Abcam, Cambridge, UK) jelenlétében is megismételtük. Az IFN- α -t 30 perccel a CpG-B kezelés előtt adtuk a sejtekhez, majd a sejteket mosási lépés nélkül nigericinnel kezeltük. Hasonlóképpen a CpG-A-val végzett kísérleteket 10, 50 vagy 100 ng/ml rekombináns humán IL-1 β (Peprotech) jelenlétében ismételtük meg. Az IL-1 β -t 30 perccel a CpG-A kezelés előtt adtuk a sejtekhez.

IV.8 A sejtek áramlási citometriás vizsgálata

A moDS-ek fenotípusának analizéséhez áramlási citometriát használtunk. Az analízist az anti-CD209-fluoreszcein-izotiocianát (FITC, klón: 9E9A8), anti-CD14-fikoeritrin (PE, klón: 63D3), anti-CD11c-PE (klón: 3.9), anti-CD1a-APC (klón: HI149), anti-CD1c-APC (klón: L161) antitestek és az izotípusukkal megegyező kontroll antitestek (mind BioLegend, San Diego, CA, USA) alkalmazásával végeztük. Az elektroporált moDS-ek életképességét áramlási citometriával is meghatároztuk, 7-aminoaktinomycin-D (7-AAD, 10 μ g/ml, Sigma-Aldrich) festéssel. A fluoreszcencia intenzitást FACS Calibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) mértük le, az adatokat pedig FlowJo szoftverrel (Tree Star, Ashland, OR, USA) elemeztük. Az adatgyűjtés során a 100000 jelölt sejtet tartalmazó mintából 10000 eseményt rögzítettünk. Hogy a sejttörmelékot kizárjuk, a fényszórási paraméterek alapján kapuztuk a sejteket. A CD14, CD209, CD1a, CD1c és CD11c antitestek esetében a pozitív festődést az izotípus kontroll antitestekhez viszonyítottuk. 7-AAD festés esetén a festetlen sejteket használtuk negatív kontrollként, és a 7-AAD negatív élő sejtek százalékos arányát a 7-AAD pozitív nekrotikus sejtpopuláció kizárásával határoztuk meg.

Az egészséges véradók és a psoriasisos betegek mintáiban intracelluláris festéssel, szintén áramlási citometria segítségével vizsgáltuk az inflammaszóma komponensek expresszióját a primer monocita és a primer pDS populációban. Ehhez először a PBMC-t anti-CD14-FITC-cel (BioLegend) és anti-BDCA4-APC-vel (CD304, Neuropilin-1, BioLegend) festettük meg, majd a BD Cytotfix/CytopermTM Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) segítségével fixáltuk és permeabilizáltuk a sejteket a gyártó utasításainak megfelelően. Mosás után a sejteket nyúl anti-NLRP3 (klón: D2P5), anti-ASC (klón: E1E3I), anti-IL-1 β (klón: D3U3E), anti-hasított IL- β (Asp116, klón: D3A3Z), anti-kaspáz-1 (klón: D7F10) és anti-hasított kaspáz-1 (p20, Asp297, klón: D57A2) antitestekkel (mind Cell Signaling, Danvers, MA, USA) inkubáltuk 30 percig. Mosás után a sejteket PE-konjugált számár anti-nyúl IgG1 másodlagos

ellenanyaggal (klón: Poly4064, BioLegend) inkubáltuk 30 percig. Izotípus kontrollként nyúl IgG-t (klón: DA1E, Cell Signaling) használtunk. Utolsó lépésként a sejteket 2%-os paraformaldehidben (Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA) vettük fel. A fluoreszcencia intenzitást FACS Calibur áramlási citométerrel mértük le, az adatokat pedig FlowJo szoftverrel értékeltük ki. Minden minta 1000000 festett sejtet tartalmazott, az adatgyűjtés során 600000 eseményt rögzítettünk. Az előre irányuló fényszórás (forward scatter, FSC) küszöbértékét 150-re állítottuk be, hogy kizárjuk a sejtörmeléket. A monocitákat CD14⁺ sejtekként azonosítottuk. A pDS-eket először BDCA4⁺ sejtekként azonosítottuk, majd a BDCA4⁺ kapun belüli sejtek eloszlását az FSC és az oldalirányú fényszórás (SSC) paraméterek alapján történő visszakupuzással elemeztük, hogy kizárjuk a tDS populációt. A 400-600-as FSC régióban található BDCA4⁺ sejtekre pDS-ként tekintettünk.

IV.9 Kvantitatív valós idejű polimeráz lánc reakció (PCR)

Az RNS-t 5×10^5 GEN2.2 sejtől vagy 1×10^6 PBMC-ből izoláltuk Tri Reagens (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) készülékkel ellenőriztük. A teljes RNS izolátumot DNáz I-gyel (Thermo Fisher Scientific) kezeltük, hogy elkerüljük a genomi DNS amplifikációját, majd az Applied Biosystems High Capacity cDNA RT Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével reverz transzkripciót végeztünk, hogy cDNS-sé írjuk át. A génexpressziós próbákat a Thermo Fisher Scientific-től vásároltuk a következő transzkriptumok esetén: NLRC5 (Assay ID: Hs01072148_m1), NLRX1 (Assay ID: Hs00226360_m1), IFNB (Assay ID: Hs01077958_s1), P2X7 (Assay ID: Hs00175721_m1), NLRP3 (Assay ID: Hs00918082_m1), IL1B (Assay ID: HS00174097_m1), kaszpáz-1 (Assay ID: Hs00354836_m1), PYCARD/ASC (Assay ID: Hs00203118_m1), CH25H (Assay ID: Hs02379634_s1), SOCS1 (Assay ID: Hs00705164_s1), CARD16/COP1 (Assay ID: Hs00430993_m1). Az Integrated DNA Technologies-től (Coralville, IA, USA) az IFNA1 (Assay ID: Hs.PT.49a.3184790.g) és a PPIA (ciklofilin A, Assay ID: Hs.PT.58v.38887593.g) próbákat szereztük be. A kvantitatív PCR-t az ABI StepOne Real-Time PCR rendszerrel (Thermo Fisher Scientific) végeztük, a ciklus küszöbértéket pedig a StepOne v2.1 szoftver (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg. Az adott mRNS normalizált expresszióját minden kísérletben a PPIA háztartási génre történő normalizálással kaptuk meg.

IV.10 Western blot analízis

A western blothoz 5×10^5 GEN2.2 sejtet vagy moDS-t Laemmli pufferben lizáltunk, majd 10 percig 100°C -on denaturáltuk a mintákat. Ezután a lizátumokat 7,5, 10 vagy 15%-os SDS-PAGE gélen elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories GmbH) elektrotranszferáltuk. A nem-specifikus kötőhelyeket 5% sovány tejpört tartalmazó TBS Tween pufferral (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) blokkoltuk. A membránokat anti-RIG-I (klón: D14G6, Cell Signaling), anti-MDA5 (klón: D74E4, Cell Signaling), anti-TBK1 (klón: D1B4, Cell Signaling), anti-MAVS (kat. sz. 3993, Cell Signaling), anti-NLRC5 (klón: 3H8, Millipore), anti-NLRX1 (kat. sz. 17215-1-AP, Proteintech Group, Manchester, UK), anti-I κ B α (klón: 44D4, Cell Signaling) anti-NLRP3 (klón: D2P5E, Cell Signaling), anti-ASC (klón: E1E3I, Cell Signaling), anti-IL-1 β (klón: D3U3E, Cell Signaling), anti-kaspáz-1 (klón: D7F10, Cell Signaling) és anti-hasított kaspáz-1 antitestekkel (p20, Asp297, klón: D57A2, Cell Signaling) inkubáltuk 1:10000 hígításban. A β -aktint (klón: C4, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) loading kontrollként használtuk 1:5000 hígításban. Az elsődleges antitestek detektálásához anti-egér (kat. sz. 1721011, Bio-Rad) vagy anti-nyúl (kat. sz. NA934, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 1:5000, illetve 1:10000 hígításban a membránokat. Ezután a fehérje sávokat enhanced chemiluminescent (ECL) rendszerrel, SuperSignal West Pico vagy Femto kemilumineszcens szubsztráttal (Thermo Fisher Scientific) és röntgenfilm expozícióval vizualizáltuk. Az immunreaktív sávok denzitometriai elemzését az Image Studio Lite szoftver 5.2-es verziójával (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) végeztük.

IV.11 Enzim-kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA)

A sejt kultúrák felülúszóit a megadott időpontokban összegyűjtöttük és az IL-1 β , TNF, IL-6 és IL-8 citokinek és kemokinek szintjét BD OptEIA humán ELISA kitekkel (mind BD Biosciences) határoztuk meg. Az IFN- α és az IFN- β szintjét a VeriKineTM Human Interferon Alpha és az Interferon Beta ELISA kitek (PBL Interferon Sources, Piscataway, NJ, USA) segítségével mértük le. A vizsgálatokat a gyártó utasításai szerint végeztük. Az abszorbancia méréseket Synergy HT mikrolemez olvasóval (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) végeztük 450 nm-en.

IV.12 Statisztikai elemzés

Az adatokat átlag \pm szórásként (SD) ábrázoltuk. A statisztikai elemzéshez varianciaanalízist (ANOVA) vagy párosítatlan Student t-tesztet alkalmaztunk, melyet

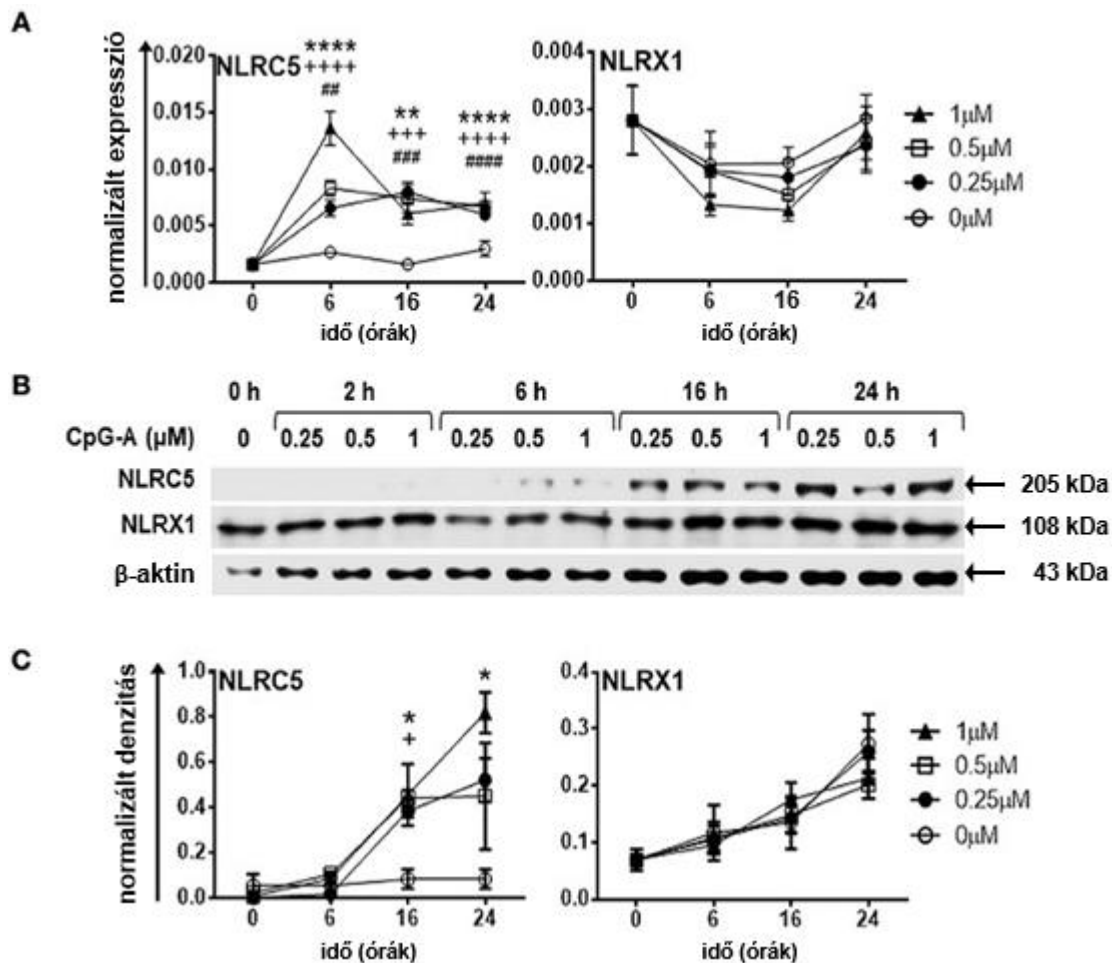
Bonferroni post hoc teszt vagy párosított Student t-teszt követett. Az adatelemzést a GraphPad Prism v.6 szoftverrel (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) végeztük. Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk. A különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $p < 0,05$ esetén.

V. Eredmények

V.1 A regulatórikus NLR-ek szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek RLR-közvetített antivirális, illetve gyulladási válaszában

V.1.1 Az NLRC5 és az NLRX1, illetve az RLR jelátviteli komponensek expressziójának vizsgálata aktiválatlan és TLR9 liganddal, CpG-A-val aktivált humán GEN2.2 pDS sejtvonalon és primer pDS-ekben

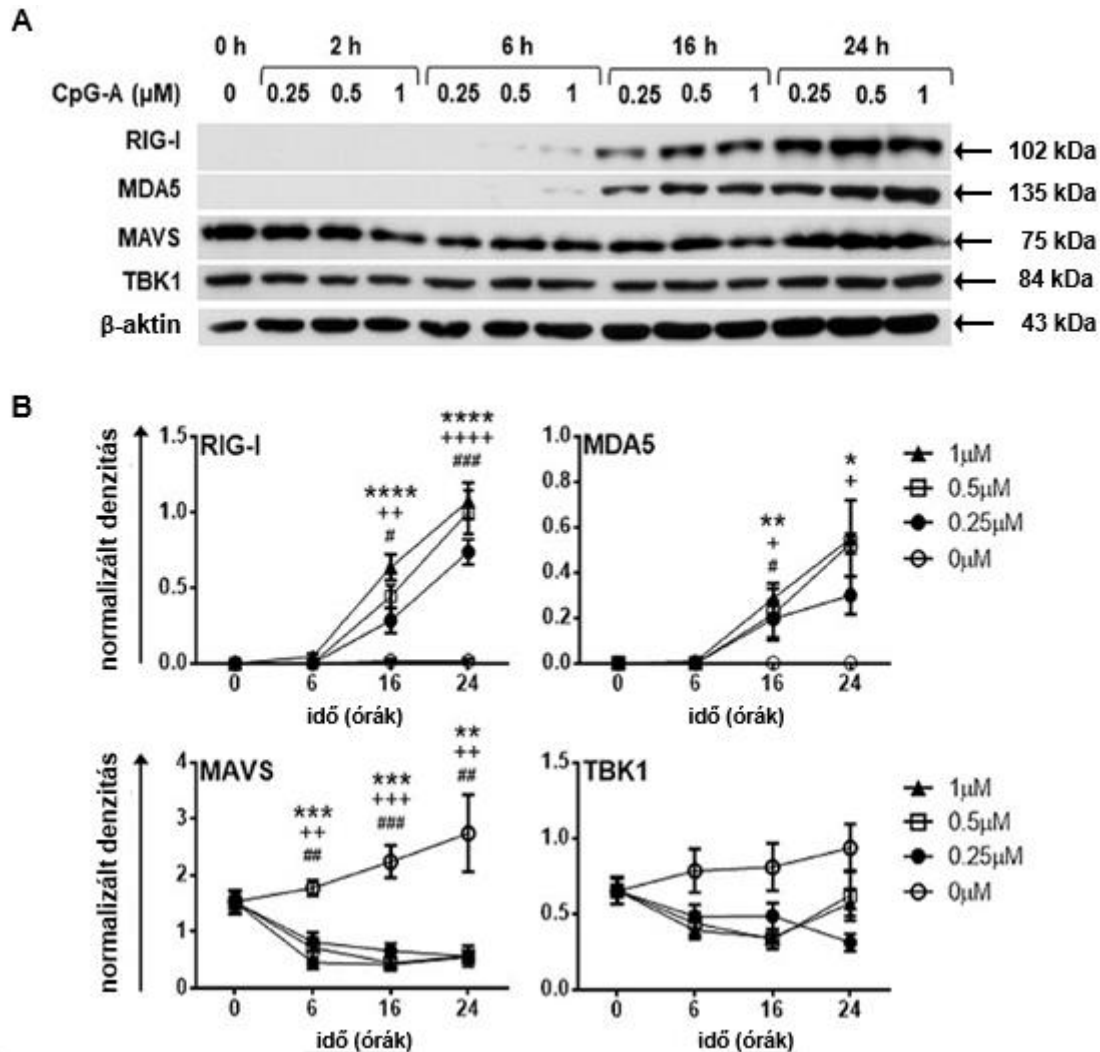
Hogy feltárjuk milyen interakciók alakulhatnak ki az NLR és RLR receptorok között, első lépésként e receptorok expressziós mintázatát vizsgáltuk meg. Mivel a primer humán pDS-ek csak nagyon alacsony százalékban találhatók meg a perifériás vérben, ezért kísérleteink nagy részét a GEN2.2 humán pDS sejtvonalon végeztük, mely hasonló fenotípusos és funkcionális tulajdonságokkal rendelkezik, mint a primer humán pDS-ek [135,238]. Először az NLRC5 és az NLRX1 expresszióját vizsgáltuk az aktiválatlan és a CpG-A-val aktivált pDS-ekben. A GEN2.2 sejteket a TLR9 ligandummal, CpG-A-val kezeltük 2, 6, 16, illetve 24 óráig. A CpG-A-t három koncentrációban (0,25; 0,5; 1 μ M) alkalmaztuk. Eredményeink alapján az NLRC5 nem fejeződik ki az aktiválatlan sejtekben, azonban mRNS (**12. A ábra**) és fehérje szinten (**12. B,C ábra**) is jelentősen fokozódik az expressziója valamennyi alkalmazott CpG-A koncentráció esetén 16 óránál. Ezzel szemben az NLRX1 konstitutívan jelen van a sejtekben és expresszióját nem befolyásolja a CpG-A stimuláció (**12. A-C ábra**).



12. ábra. A CpG-A kezelés fokozza az NLRC5 expresszióját, míg az NLRX1 expresszióra nincs hatással a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket időfüggő módon CpG-A-val (0,25; 0,5; 1 μM) kezeltük (A-C). Az NLRC5 és az NLRX1 expresszióját mRNA szinten Q-PCR-al (A) és fehérje szinten western blot segítségével (B,C) vizsgáltuk. A reprezentatív blotok a (B) panelen láthatók. A feltüntetett adatok 4-6 független kísérlet átlagát ± SD értékét mutatják. Az adatokat egyutas ANOVA-val elemeztük, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ 1 μM CpG-A vs kontroll; + $p < 0,05$, +++ $p < 0,001$, ++++ $p < 0,0001$ 0,5 μM CpG-A vs kontroll; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ 0,25 μM CpG-A vs kontroll.

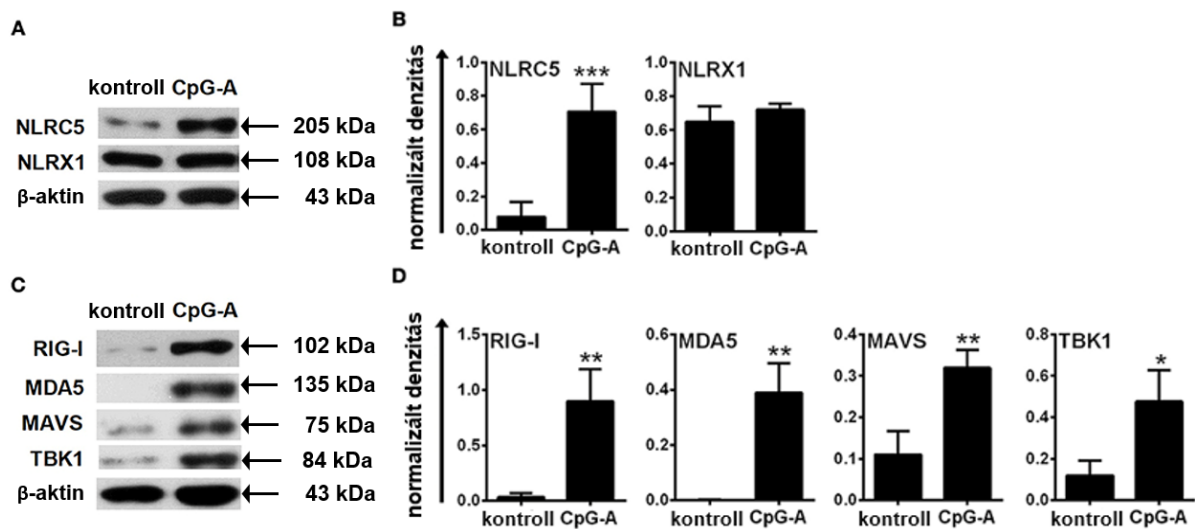
Ezután megvizsgáltuk az RLR receptor család két tagjának és az RLR jelátviteli útvonal downstream molekuláinak is az expresszióját (13. A,B ábra). Fokozott RIG-I és MDA5 expressziót tapasztaltunk már a legalacsonyabb koncentrációjú 16 órás CpG-A kezelés hatására is (13. A,B ábra), ami egybevág korábbi eredményeinkkel [215]. Ismert, hogy a szintetikus ssRNS-ek és dsRNS-ek a MAVS expressziót csökkentik [239]. Ennek megfelelően mi is megfigyeltük, hogy a GEN2.2 sejtekben a CpG-A kezelést követően a MAVS fehérje szintje csökken (13. A,B ábra). Ez a mechanizmus alapvető fontosságú lehet a túlzott gyulladási válaszok megelőzésében. A TBK1, a MAVS-IFN jelátviteli útvonal kulcsfontosságú szabályozó fehérjéjének kifejeződését nem befolyásolta a CpG-A stimuláció (13. A,B ábra). Korábban már leírtuk, hogy a 0,25 μM-os CpG-A kezelés képes a GEN2.2 sejtekben a RIG-I

expresszió fokozására anélkül, hogy közben IFN termelést indukálna, és így nem vezet a pDS-ek kimerüléséhez [215]. Mivel a RIG-I, az MDA5 és az NLRC5 szintje szignifikánsan megnőtt a 16 órás 0,25 μM -os CpG-A kezelés hatására, úgy döntöttünk, hogy ezt a kezelést alkalmazzuk a GEN2.2 sejtvonalal végzett további kísérleteinkben a receptor interakciók feltárásakor.



13. ábra. A CpG-A kezelés fokozza a RIG-I és az MDA5 expresszióját, míg csökkenti a MAVS expressziót, a TBK1 expresszióra pedig nincs hatással a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket időfüggő módon CpG-A-val (0,25; 0,5; 1 μM) kezeltük (A,B). A RIG-I, az MDA5, a MAVS és a TBK1 fehérjék CpG-A indukált expresszió változását western blot módszerrel detektáltuk (A,B). A reprezentatív blotok az (A) panelen láthatók. A feltüntetett adatok 4-6 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják. Az adatokat egyutas ANOVA-val elemeztük, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ 1 μM CpG-A vs kontroll; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$, ++++ $p < 0,0001$ 0,5 μM CpG-A vs kontroll; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ 0,25 μM CpG-A vs kontroll.

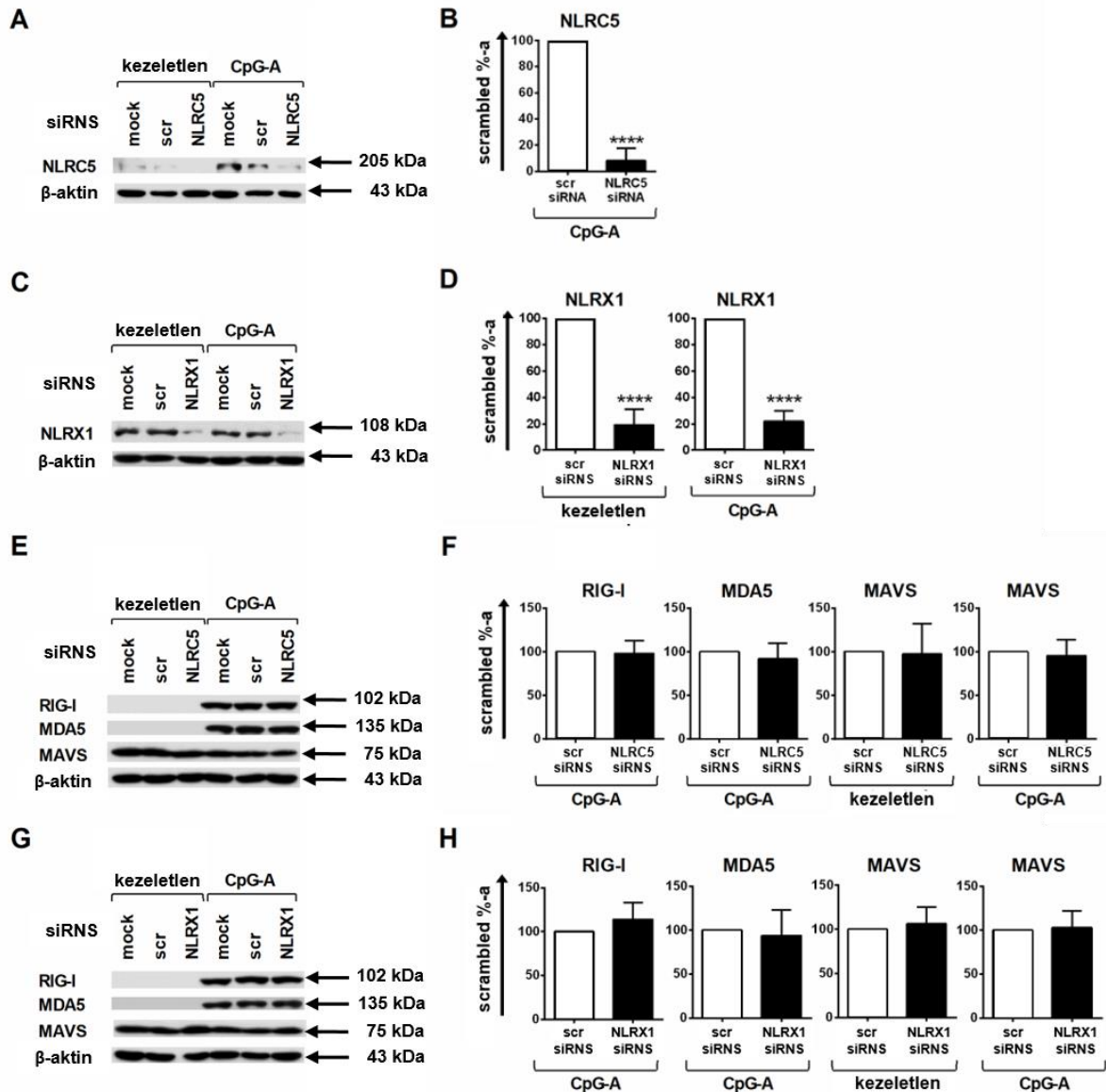
Hasonló eredményeket kaptunk a frissen izolált primer humán pDS-ek esetében is. Míg az NLRX1 fehérje folyamatosan kifejeződik, addig az NLRC5 csak CpG-A stimuláció hatására indukálható a primer pDS-ekben (14. A,B ábra). Továbbá a RIG-I, az MDA5, a MAVS és a TBK1 expresszió is jelentős mértékben megemelkedik a CpG-A kezelést követően (14. C,D ábra). Megfigyeléseink tehát arra utalnak, hogy a GEN2.2 sejtek releváns sejtmodellként szolgálhatnak az NLR és RLR receptorok közötti kölcsönhatások tanulmányozására a humán pDS-ekben, azonban a MAVS és a TBK1 kifejeződés eltérően szabályozott a két modellben.



14. ábra. A CpG-A kezelés indukálja az NLRC5, a RIG-I, az MDA5 a MAVS és a TBK1 expressziót a primer humán pDS-ekben. A frissen izolált primer humán pDS-eket 2,5 μ M CpG-A-val stimuláltunk 16 órán keresztül, majd az NLRC5, NLRX1, RIG-I, MDA5, MAVS és TBK1 fehérje szintjét western blot módszer segítségével detektáltuk. A reprezentatív blotok az (A,C) panelen láthatóak. Az adatok 3-4 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják. A statisztikai elemzéshez párosított Student t-próbát használtunk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

V.1.2 Az NLRC5 és az NLRX1 csendesítés hatásának vizsgálata az RLR jelátviteli komponensek expressziójára GEN2.2 sejtekben

A pDS-ek leginkább arról ismertek, hogy vírusfertőzések hatására nagy mennyiségű I-es típusú IFN-t, valamint a pro-inflammatorikus citokinek széles skáláját termelik [72]. Ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy az NLR-ek képesek-e szabályozni a pDS-ek RIG-I-közvetített antivirális válaszait. Ezért siRNS-mediált géncsökkentést végeztünk, hogy depletáljuk az NLRC5 és az NLRX1 fehérjét a GEN2.2 sejtekben. A transzfekciót követően 24 órával a sejteket 16 óráig 0,25 μ M CpG-A-val stimuláltuk, majd a géncsökkentés hatékonyságát és az RLR jelátviteli fehérjék expresszióját western blot módszer segítségével ellenőriztük (**15. ábra**). Az alkalmazott siRNS-ek szignifikánsan csökkentették (>80%) az NLRC5 és az NLRX1 fehérjék szintjét az aktiválatlan és az aktivált sejtekben (**15. A-D ábra**). A RIG-I, az MDA5 és a MAVS fehérjeszinteket is megvizsgáltuk, hogy feltárjuk vajon az NLRC5 vagy az NLRX1 depléciója befolyásolja-e az expressziójukat. Eredményeink alapján az siRNS-transzfekció nem változtatta meg az RLR jelátviteli fehérjék expressziós mintázatát, nem volt hatással a RIG-I, az MDA5 és a MAVS szintjére sem az aktiválatlan, sem az aktivált sejtekben (**15. E-H ábra**).

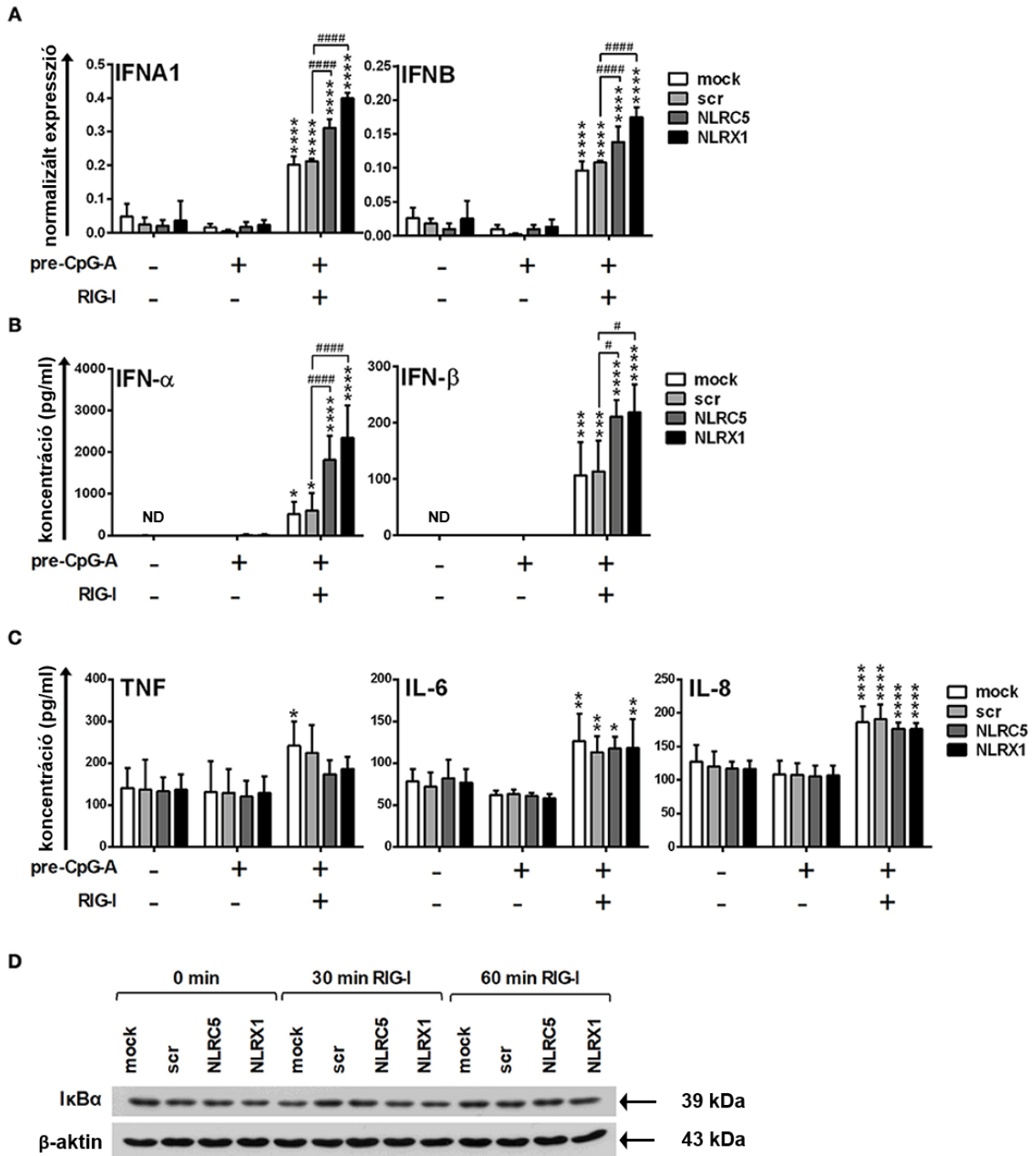


15. ábra. Az NLR5 vagy az NLRX1 csendesítése nem befolyásolja az RLR-ek és a MAVS fehérje szintjét a GEN2.2 sejtekben. A sejteket NLR5, NLRX1 vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNS-ekkel transzfektáltuk (A-H). A sejteket 24 óra elteltével 16 órán keresztül 0,25 μ M CpG-A-val kezeltük, majd western blot analízissel vizsgáltuk a géncsökkentés hatékonyságát (A-D), illetve a RIG-I, MDA5 és MAVS fehérjék szintjét (E-H). Az A,C,E,G paneleken reprezentatív blotok láthatók. Az oszlopdiagramok az NLR5 (B) és az NLRX1 (D) csendesítésének hatékonyságát, valamint a RIG-I, az MDA5 és a MAVS fehérjék kifejeződését (F,H) ábrázolják a negatív kontrollhoz (scr) képest, ahol a scrambled-et 100 százalékknak vettük. A (B,D,F,H) paneleken 4-8 független kísérlet átlaga \pm SD értéke látható. A statisztikai elemzéshez párosított Student t-próbát használtunk. **** $p < 0,0001$

V.1.3 Az NLRC5 és az NLRX1 szerepének vizsgálata a GEN2.2 sejtek RLR-indukált I-es típusú IFN, illetve pro-inflammatorikus válaszában

A sikeres transzfekciót követően az aktiválatlan vagy a CpG-A-val előkezelt sejteket a RIG-I specifikus ligandumával, 5'ppp-dsRNS-sel aktiváltuk. Érdekes módon az NLRC5 és az NLRX1 depléciója fokozta az *IFNA1* és az *IFNB* transzkriptumok szintjét (**16. A ábra**), és nagyobb mértékű IFN- α és IFN- β termelést eredményezett az 5'ppp-dsRNS kezelést követően (**16. B ábra**). Ez arra utal, hogy mind az NLRC5, mind az NLRX1 negatív szabályozó szerepet játszik a humán pDS-ek RIG-I-közvetített antivirális válaszában.

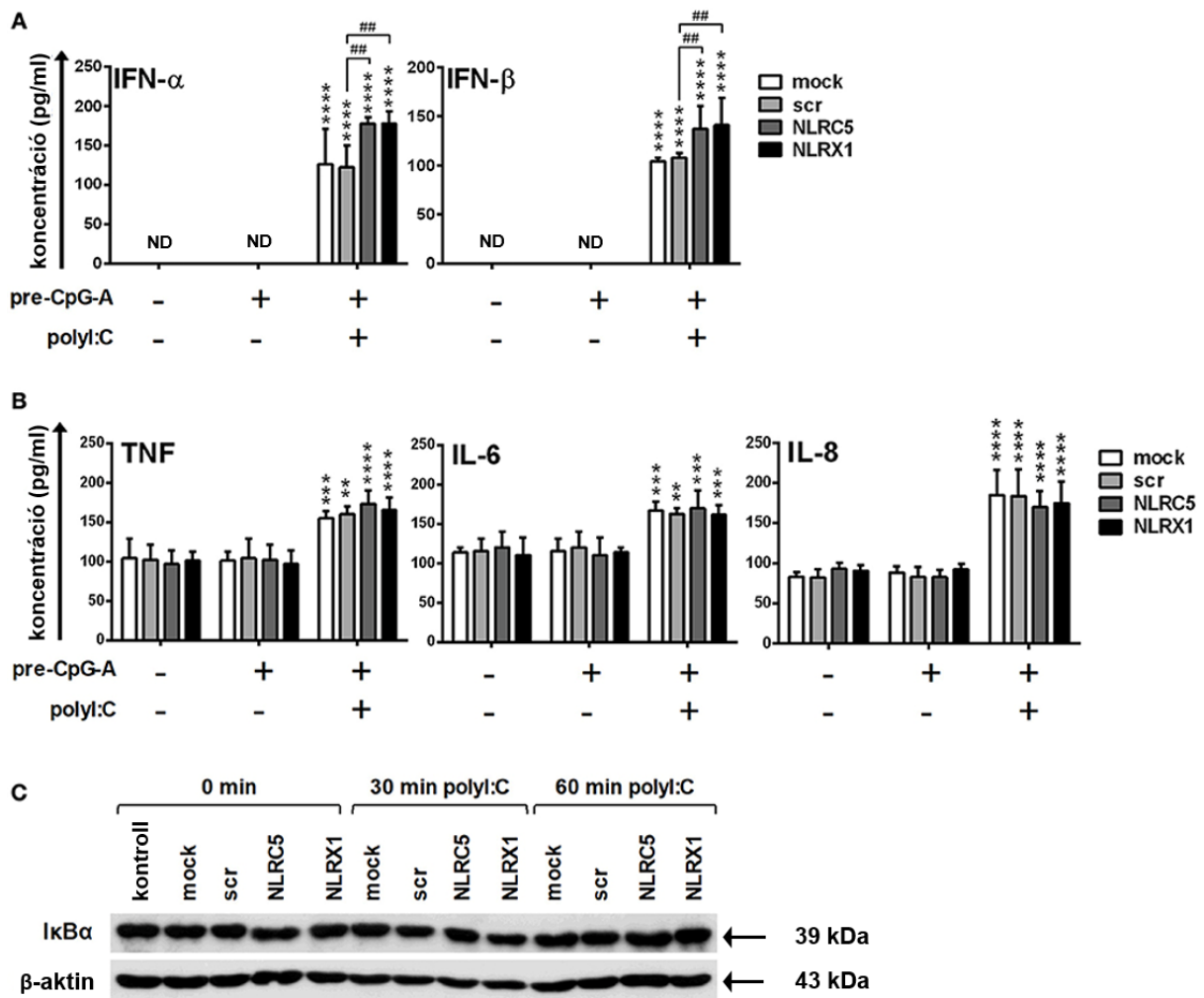
Az IFN-ok mellett a pDS-ek vírusfertőzés hatására pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek termelésére is képesek [72], ezért ELISA segítségével vizsgáltuk az IL-6 és TNF pro-inflammatorikus citokinek és az IL-8 kemokin szekréciónak a sejt kultúrák felülszójában. Amint a **16. C ábrán** látható, a GEN2.2 sejtekben a vizsgált fehérjék alacsony szinten konstitutívan termelődtek, és a RIG-I stimuláció hatására csak kismértékben nőtt meg a szekréciónak. Érdekes módon az I-es típusú IFN-okkal ellentétben a TNF, az IL-6 és az IL-8 szekréciónak nem befolyásolta az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítése. Hogy megerősítsük, hogy az NLRC5 és az NLRX1 nem befolyásolta-e az NF- κ B jelátviteli útvonalat, vizsgáltuk az NF- κ B útvonal aktivitását gátló fehérje, az NF- κ B inhibitor α ($I\kappa B\alpha$) degradációs kinetikáját is (**16. D ábra**). Az $I\kappa B\alpha$ degradációja az NF- κ B p50 és p65 alegységeinek felszabadulásához vezet, lehetővé téve azok nukleáris transzlokációját és ezt követően a célgének aktiválódását [240]. Érdekes módon a RIG-I stimuláció nem indukálta az $I\kappa B\alpha$ degradációját, ami korrelált az általunk megfigyelt gyenge pro-inflammatorikus citokin termeléssel. Ez arra utalhat, hogy a pDS-ekben nem kanonikus módon a RIG-I elsősorban az I-es típusú IFN-ok termelését indukálja a pro-inflammatorikus citokinekével szemben. Ez a megfigyelésünk összhangban van korábbi, állatokon végzett *in vivo* vizsgálatok eredményeivel [241].



16. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítése fokozza a specifikus RIG-I agonista indukált I-es típusú IFN termelést, míg az NF-κB jelátviteli útvonalra nincs hatással a GEN2.2 sejtekben. A sejteket 24 óráig NLRC5 vagy NLRX1 specifikus siRNS-ekkel vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNS-ekkel transzfektáltuk, majd 16 órán keresztül 0,25 μM CpG-A-val (pre-CpG-A) előkezeltük őket, hogy indukáljuk az RLR-ek citoszólikus expresszióját (A-D). Alapos mosási lépéseket követően a sejteket a RIG-I specifikus agonistával, 5'ppp-dsRNS-sel (RIGL, 1 μg/ml) stimuláltuk. Az *IFNA1* és *IFNB* mRNS-ek szintjét Q-PCR segítségével 3 óra elteltével (A), míg az IFN-α, IFN-β (B), TNF, IL-6 és IL-8 (C) fehérjék szintjét ELISA-val 6 (B) vagy 24 óra múlva (C) vizsgáltuk. Az IκBα degradációjának kinetikáját western blottal határoztuk meg (D). A (D) panelen egy reprezentatív blot látható. Az adatok 3-5 független kísérlet átlagát ± SD értékekét mutatják, a statisztikai elemzéshez pedig együttes ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk (A-C). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. pre-CpG-A kezelt minták; #p < 0,05, #####p < 0,0001. ND: nem detektálható.

Hasonló kísérletekben a CpG-A előkezelést követően a sejteket a specifikus RIG-I agonista 5'ppp-dsRNS helyett polyI:C-vel stimuláltuk (**17. ábra**). A polyI:C a citoplazmatikus RIG-I/MDA5, illetve az endoszomális TLR3 receptor ligandja. Míg a nem transzfektált polyI:C az endoszómába szállítódva a TLR3 által ismerődik fel a sejtekben, addig a transzfektált polyI:C-t főleg a citoszólikus RIG-I/MDA5 érzékeli [242]. Így kísérleteinkben nagy molekulásúlyú polyI:C-t alkalmaztunk LyoVec transzfekeciós reagenssel komplexben, melynek felismerésére csak az RLR-ek képesek. Bár a LyoVec-konjugált polyI:C mind a RIG-I, mind az MDA5 számára agonistaként szolgálhat, mégis a ligand nagy molekulásúlyú formáját főként az MDA5 ismeri fel [243, 244]. Korábbi specifikus RIG-I agonistával kapott eredményeinkhez hasonlóan az NLRC5 és az NLRX1 depléciója növelte az I-es típusú IFN-ok polyI:C indukált szekrécióját is (**17. A ábra**), azonban nem befolyásolta a pro-inflammatórikus citokinek termelését (**17. B ábra**) és az NF- κ B útvonal aktivitását (**17. C ábra**).

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az NLRC5 és az NLRX1 esszenciális szabályozó szerepet játszik a pDS-ek RLR-közvetített I-es típusú IFN válaszában, míg nem befolyásolja az NF- κ B útvonal aktivitását, és így a humán pDS-ek pro-inflammatórikus citokin termelését.

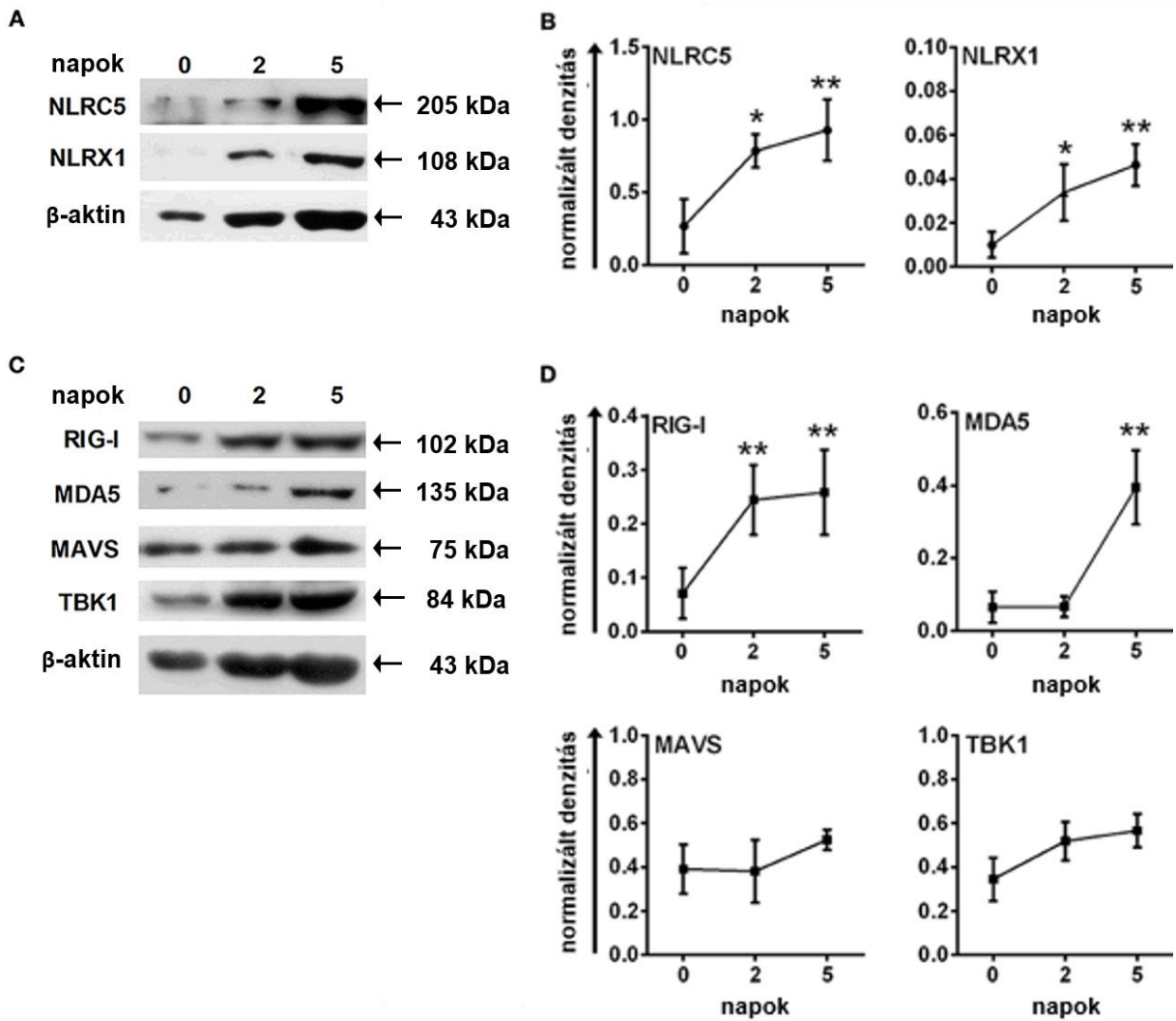


17. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítése fokozza a RIG-I/MDA5 agonista indukált I-es típusú IFN termelést, míg az NF- κ B jelátviteli útvonalra nincs hatással a GEN2.2 sejtekben. A sejteket 24 óráig NLRC5 vagy NLRX1 specifikus siRNS-ekkel vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNS-ekkel transzfektáltuk, majd 16 óráig 0,25 μ M CpG-A-val (pre-CpG-A) előkezeltük, hogy indukáljuk az RLR-ek citoszólikus expresszióját (A-C). Alapos mosási lépéseket követően a sejteket a RIG-I/MDA5 agonistájával, polyI:C-vel (1 μ g/ml) stimuláltuk. Az IFN- α , IFN- β (A), TNF, IL-6 és IL-8 (B) fehérjék koncentrációját ELISA-val vizsgáltuk 6 (A) vagy 24 óra elteltével (B). Az I κ B α lebomlásának kinetikáját western blottal határoztuk meg (C). A (C) panelen egy reprezentatív blot látható. Az adatok 4 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutaták. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztet végeztünk. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,0001$ vs. pre-CpG-A kezelt minták; ## $p < 0,01$. ND: nem detektálható.

V.1.4 A moDS-ek NLRC5 és NLRX1 expressziós profiljának vizsgálata

A különböző DS altípusok eltérő gyulladáshoz vezető citokin profillal rendelkeznek nyugalmi állapotban és gyulladáshoz vezető körülmények mellett [245]. Hogy megvizsgáljuk, hogyan befolyásolja az NLRX1 és az NLRC5 más DS alcsoportok RIG-I-közvetített immunválaszt, kísérleteinket megismételtük moDS-ekkel is. Gyulladáshoz vezető körülmények között a monociták moDS-ekké differenciálódhatnak és mikrobiális ingerek hatására nagy mennyiségű pro-inflammatorikus és/vagy antivirális citokint képesek termelni, így befolyásolják a veleszületett és az adaptív immunválaszokat [20,246,247]. Ezért a humán vérből izolált CD14⁺ monocitákból GM-CSF és IL-4 jelenlétében *in vitro* moDS-eket differenciáltattunk, melyek kiváló modellként szolgálnak a DS-funkciók tanulmányozására.

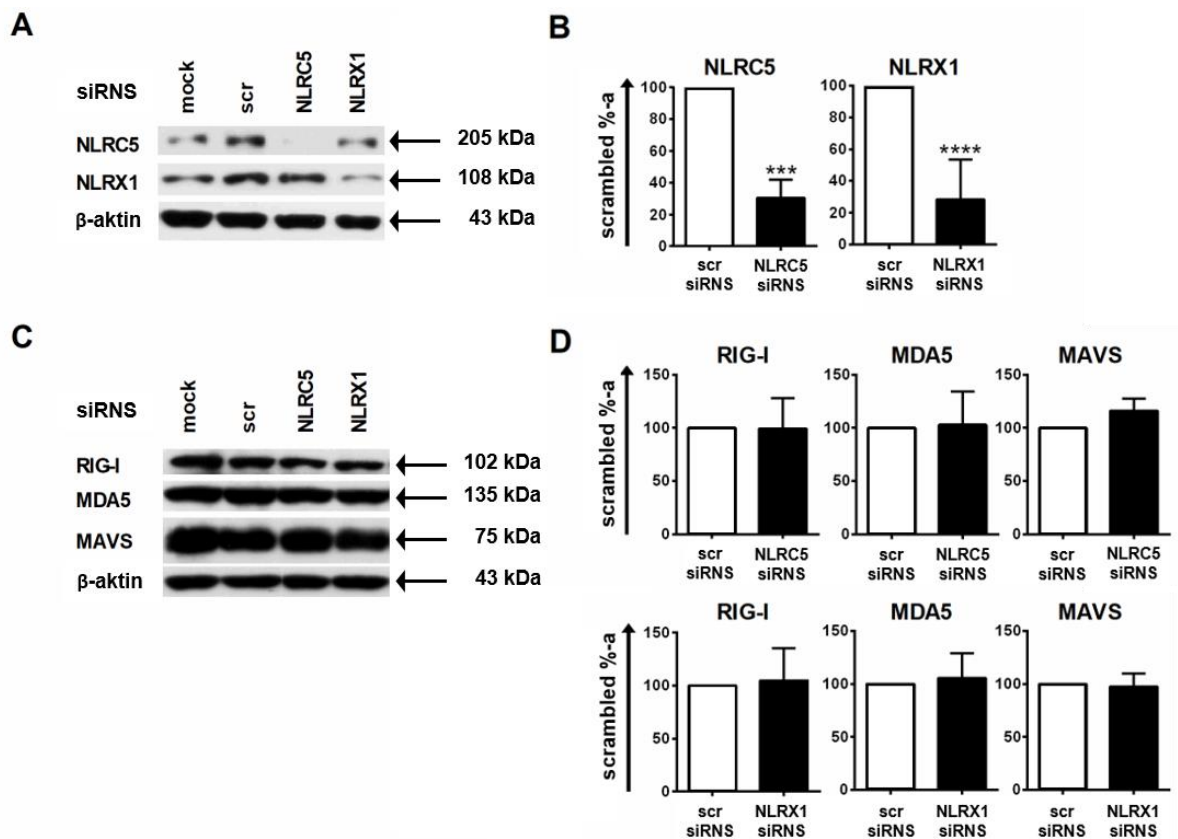
Először az NLRC5, az NLRX1, valamint az RLR jelátviteli molekulák expressziós profilját elemeztük a moDS-ek differenciálódása során (**18. ábra**). Eredményeink alapján az NLRC5 és az NLRX1 nem detektálható vagy csak gyengén expresszálódik a frissen izolált monocitákban, azonban szintjük fokozatos emelkedést mutat a moDS-ek differenciálódása során (**18. A,B ábra**). Hasonlóképpen, a RIG-I, az MDA5 expresszió, illetve a downstream jelátviteli komponenseik, mint a MAVS és a TBK1 szintje is fokozódik a monocita-moDS differenciáció során (**18. C,D ábra**).



18. ábra. A humán moDS-ek a DS differenciáció 5. napján stabilan kifejezik az NLRC5, NLRX1, RIG-I és MDA5 fehérjéket. A frissen izolált monocitákat 24 lyukú sejtenyésző lemezekre osztottuk szét, majd GM-CSF és IL-4 jelenlétében moDS-ekké differenciáltattuk őket. Az NLRC5, NLRX1, RIG-I, MDA5, MAVS és TBK1 fehérjék szintjét western blot segítségével vizsgáltuk. Az (A,C) panelen reprezentatív blotok láthatók. A grafikonok a moDS-ek differenciálódása során a vizsgált fehérjék expressziós kinetikáját ábrázolják (B,D). Az adatok 3-5 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. 0. nap.

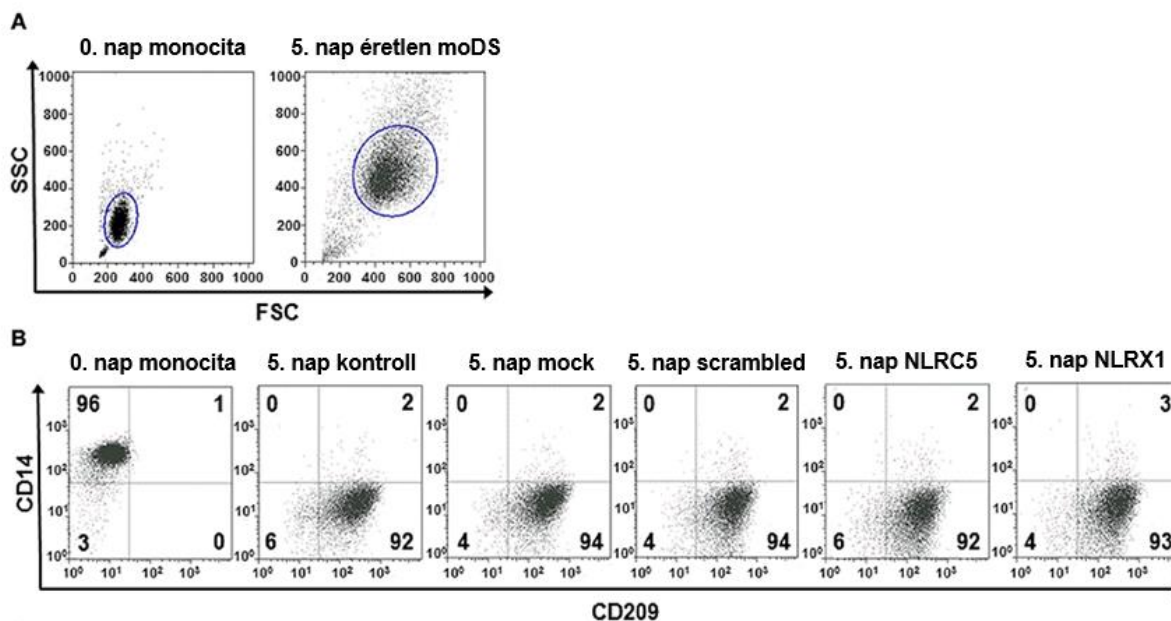
A következő lépésben a frissen izolált CD14⁺ monocitákat siRNS-ekkel transzfektáltuk a DS differenciáció 0. napján, mely módszert korábban már sikeresen optimalizáltunk és alkalmaztunk a célgének csendesítésére moDS-ekben [248]. A monocitákat NLRC5 vagy NLRX1 specifikus siRNS-ekkel, illetve scrambled kontroll siRNS-sel transzfektáltuk az „Anyagok és módszerek” fejezetben leírtak szerint, majd a moDS differenciáció 5. napján western blot segítségével vizsgáltuk a csendesítés hatékonyságát (19. A,B ábra). Eredményeink alapján az NLRX1 és az NLRC5 depléciónak is sikeresnek tekinthető, mivel nagyfokú expresszió csökkenést tapasztaltunk mindkét NLR esetben (19. A,B ábra), továbbá

megállapítottuk, hogy a csendesítés nem befolyásolta a RIG-I, az MDA5 és a MAVS expresszióját sem az éretlen moDS-ekben (19. C,D ábra).



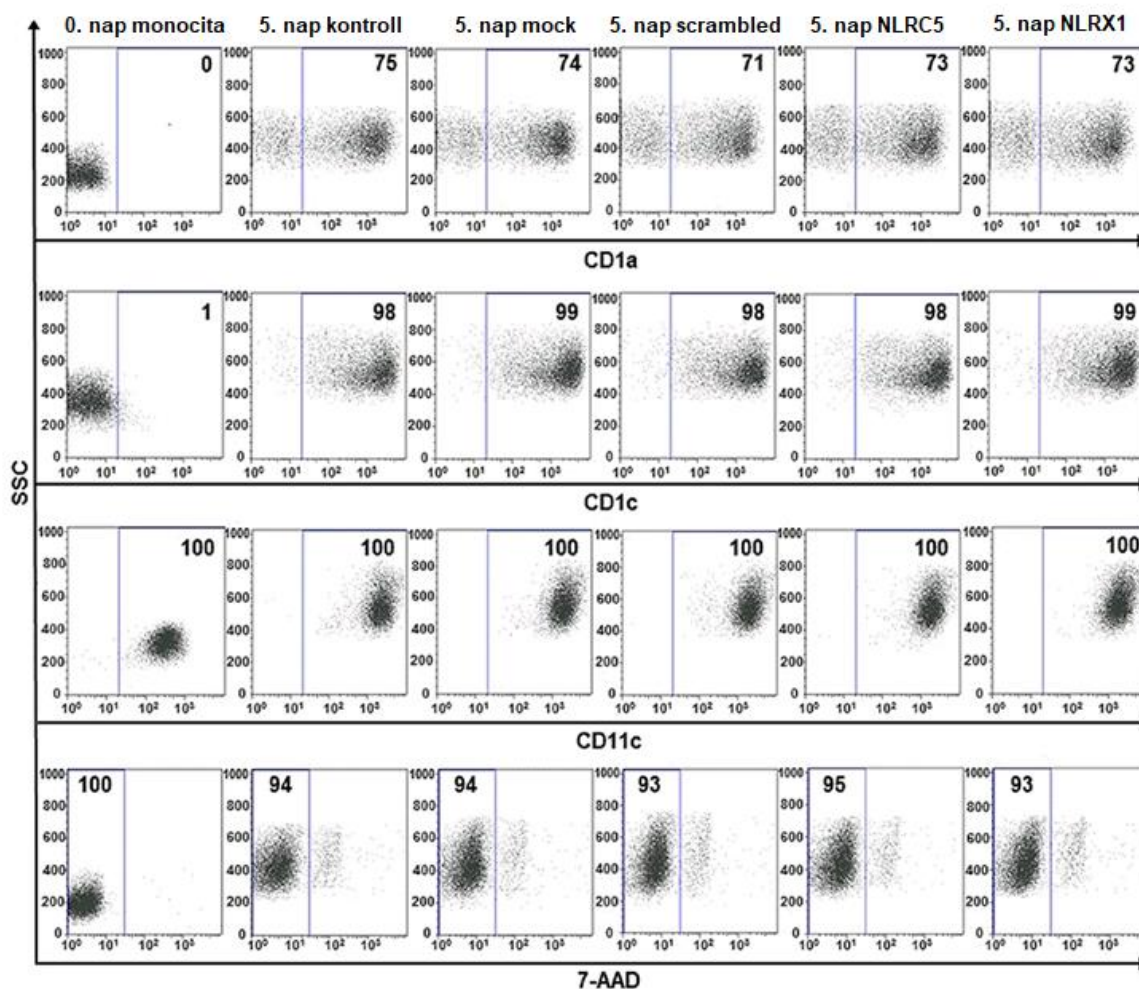
19. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 sikeres csendesítése nem befolyásolja az RLR-ek és a MAVS kifejeződését a humán éretlen moDS-ekben. A frissen izolált monocitákat az ábrán jelzett siRNS-ekkel transzfektáltuk és moDS-ekké differenciáltattuk őket (A-D). Az 5. napon a géncsendesítés hatékonyságát (A,B), illetve a RIG-I, MDA5 és MAVS fehérjék szintjét (C,D) western blot analízissel vizsgáltuk. Az (A,C) paneleken reprezentatív blotok láthatók. Az oszlopdiagramok az NLRC5 és NLRX1 csendesítésének hatékonyságát (B), valamint a RIG-I, az MDA5 és a MAVS fehérjék kifejeződését (D) ábrázolják a negatív kontrollhoz (scr) képest, ahol a scrambled-et 100%-nak vettük. A (B,D) paneleken 4-9 független mérés átlaga \pm SD értéke szerepel, a statisztikai elemzést párosított Student t-próbával végeztük. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. scr: scrambled.

Hogy megerősítsük, hogy a géncsendesítés nem befolyásolja a CD14⁺CD209⁻ monociták CD14⁻CD209⁺ moDS-ekké történő differenciálódását sem, megvizsgáltuk a monocita specifikus sejtfelszíni marker, a CD14 és a DS specifikus CD209 expresszióját is a differenciáció során (20. ábra). Az FSC-SSC paraméterek alapján kapuzott monocita és DS populációkon belül vizsgálva e markerek szintjét (20. A ábra), elmondható, hogy a CD209/CD14 arány a moDS differenciálódás 5. napján az siRNS-ekkel transzfektált sejtekben hasonló szinten emelkedett a kezeltlen sejtekhez képest, azaz a CD14-et elveszítették, míg a CD209-et magas szinten expresszálták. Tehát eredményeink alapján az NLRC5 vagy az NLRX1 hiánya nem befolyásolja a moDS-ek differenciálódási folyamatait (20. B ábra).



20. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítése nem befolyásolja a moDS differenciációt. A frissen izolált monocitákat NLRC5-, NLRX1-specifikus vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNS-ekkel transzfektáltuk a 0. napon és éretlen moDS-ekké differenciáltattuk őket. A differenciálódás 5. napján a sejtek fenotípusos elemzését áramlási citometriával végeztük el (A, B). A sejteket a sejtörmelék kizárása érdekében az FSC-SSC paraméterek alapján kapztuk (A), majd megvizsgáltuk a CD14 és CD209 (B) sejtfelszíni fehérjék expressziós szintjét (B). Az (A, B) panelen 3 független kísérletből származó reprezentatív dot plotok láthatóak. Izotípus kontroll segítségével kapztuk ki a DS markerekre pozitívást mutató populációkat, a dot plotokon feltüntetett számok pedig a pozitív sejtek százalékos arányát jelzik (B). FSC: előre irányuló fény szórási, SSC: oldalirányú fény szórási.

Hogy megvizsgáljuk a géncsendesítés hatását a moDS-ek fenotípusára, a DS-ekre jellemző sejt felszíni markerek, többek között a CD1a, CD1c és CD11c expresszióját is ellenőriztük áramlási citometria segítségével (**21. ábra**). Eredményeink alapján az összes DS specifikus marker magas szinten (CD1a: >71%, CD1c: >98%, CD11c: 100%) expresszálódik az éretlen moDS-ek felszínén, függetlenül az NLRC5 és az NLRX1 csendesítésétől (**21. ábra**). Továbbá a sejtek életképességét 7-AAD festéssel vizsgálva megállapítottuk, hogy az siRNS transzfekció a moDS-ek életképességét sem befolyásolta (**21. ábra**).

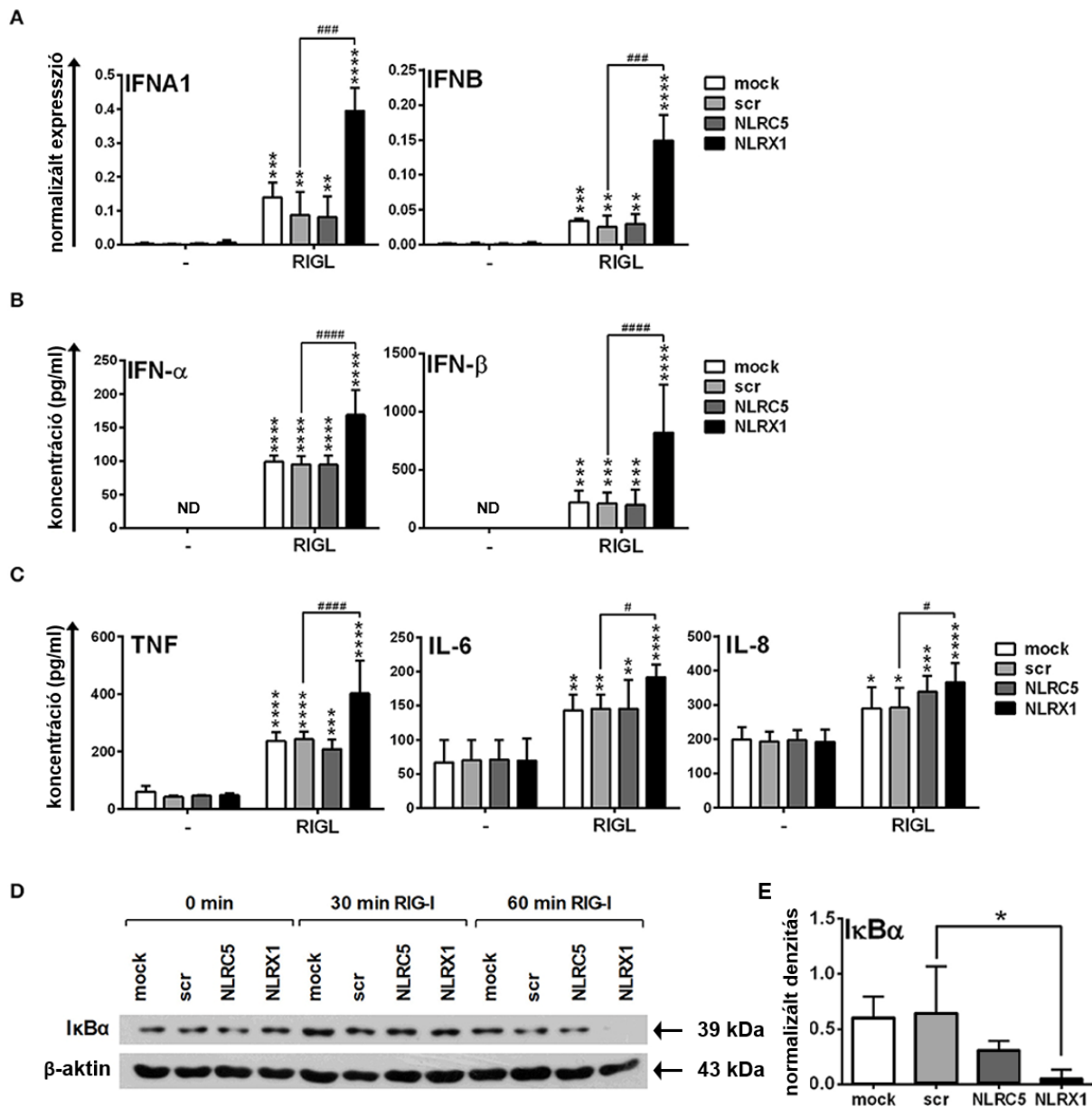


21. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítése nem befolyásolja a humán éretlen moDS-ek fenotípusát és életképességét. A frissen izolált monocitákat NLRC5-, NLRX1-specifikus vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNS-ekkel transzfektáltuk a 0. napon és éretlen moDS-ekké differenciáltattuk őket. A differenciálódás 5. napján a sejtek fenotípusos elemzését áramlási citometriával végeztük el. Megvizsgáltuk a CD1a, CD1c és CD11c sejt felszíni fehérjék expressziós szintjét és a sejtek életképességét. Az ábrán 3 független kísérletről származó reprezentatív dot plotok láthatóak. Izotípus kontroll segítségével kaptuk ki a DS markerekre pozitívítást mutató populációkat, a dot plotokon feltüntetett számok pedig a pozitív sejtek százalékos arányát jelzik, kivéve a 7-AAD festés esetén, ahol a számok a 7-AAD negatív, élő sejtek arányát mutatják. 7-AAD: 7-aminoaktinomycin-D, SSC: oldalirányú fényszórás.

V.1.5 Az NLRX1 és az NLRC5 szabályozó szerepének feltárása a moDS-ek RLR-közvetített antivirális és pro-inflammatorikus válaszában

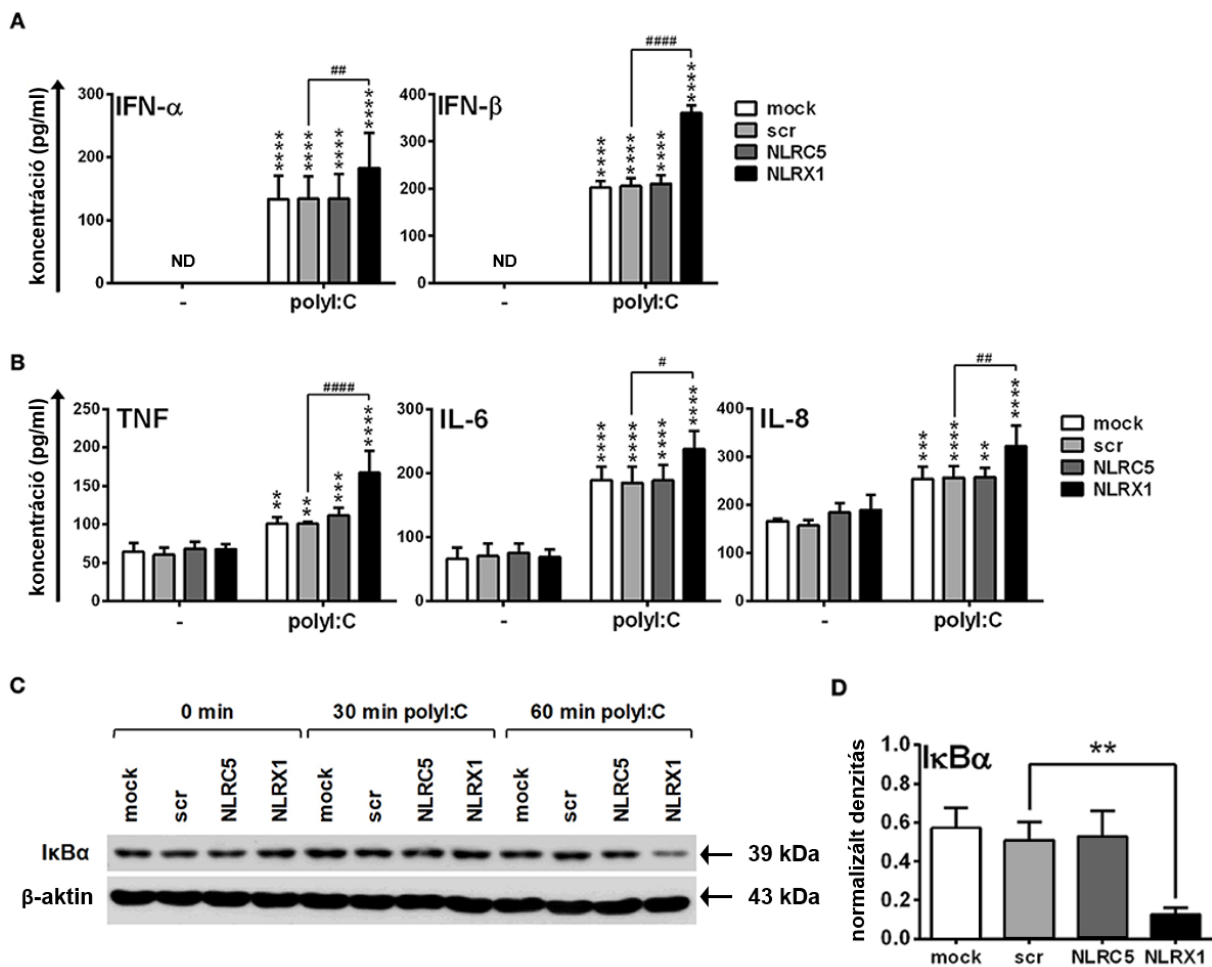
A transzfekciót követően az aktiválatlan moDS-eket az 5. napon a RIG-I specifikus agonistájával, 5'ppp-dsRNS-sel stimuláltuk, majd elemeztük a sejtek antivirális (**22. A,B ábra**) és pro-inflammatorikus citokin, valamint kemokin profilját (**22. C ábra**). Először az IFN- α és az IFN- β , a moDS-ek által leginkább termelt I-es típusú IFN-ok termelődését vizsgáltuk. Érdekes módon a RIG-I indukált I-es típusú IFN választ nem befolyásolta az NLRC5 csendesítése (**22. A,B ábra**), míg az NLRX1 csendesítése mind mRNS, mind fehérje szinten

fokozta azt (**22. A,B ábra**). A TNF, az IL-6 és az IL-8 viszonylag alacsony szinten aktiváció nélkül is szekretálódott az éretlen moDS-ekben, szekréciójuk azonban jelentős mértékben megnövekedett a RIG-I stimuláció hatására (**22. C ábra**). Azonban a moDS-ek IFN válaszához, illetve a GEN2.2 sejtek pro-inflammatórikus válaszához hasonlóan az NLRC5 csendesítése nem befolyásolta a TNF, az IL-6 és az IL-8 szekrécióját a moDS-ek esetében sem. Ugyanakkor e citokinek aktivációt követő szekréciója jelentősen megnövekedett az NLRX1 siRNS-sel csendesített sejtekben a scrambled siRNS-transzfektált sejtekhez képest. Ezzel összhangban fokozott NF- κ B aktivitást detektáltunk az NLRX1 csendesített moDS-ekben, ugyanis az 5'ppp-dsRNS kezelés 60. percében fokozott I κ B α degradáció volt megfigyelhető (**22. D,E ábra**).



22. ábra. Az NLRX1 negatívan befolyásolja a specifikus RIG-I agonista indukált I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus citokin választ a humán moDS-ekben, míg az NLRC5 nincs hatással rá. A jelzett siRNS-ekkel transzfektált moDS-eket RIG-I specifikus ligandummal, 5'ppp-dsRNS-sel (RIGL, 1 µg/ml) stimuláltuk (A-E). Az *IFNA1* és *IFNB* mRNS-ek expresszióját Q-PCR-al határoztuk meg 12 óra elteltével (A), az IFN-α, IFN-β (B), TNF, IL-6 és IL-8 (C) fehérje szinteket pedig ELISA-val 24 óra múlva vizsgáltuk. Az IκBα degradációjának kinetikáját western blottal határoztuk meg (D,E). A (D) panelen egy reprezentatív blot látható. Az (E) panelen látható oszlopdiagramok az IκBα normalizált denzitását mutatják a stimuláció 60. percében. Az adatok 4 független kísérlet átlagát ± SD értékét mutatják, a statisztikai elemzéshez pedig egyutas ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztet használtunk (A-C, E). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ vs. kezeletlen vagy scr; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$. ND: nem detektálható, scr: scrambled.

Ezt követően a GEN2.2 sejtekhez hasonlóan a moDS-eket is stimuláltuk nagy molekulású polyI:C-LyoVec komplexszel, mely az 5'ppp-dsRNS-hez hasonló módon indukálta az I-es típusú IFN-ok és a pro-inflammatorikus citokinek termelődését (23. ábra). Az NLRX1 csendesítése tovább fokozta a sejtek aktiváció-indukált citokin szekrécióját, míg az NLRC5 depléciója nem befolyásolta a moDS-ek I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus citokin termelését sem (23. A,B ábra). Továbbá a polyI:C kezelést követően az I κ B α degradáció is csak az NLRX1 csendesített sejtekben volt kifejezettebb, hasonlóan a 60 perces 5'ppp-dsRNS-sel történő kezeléshez (23. C,D ábra).

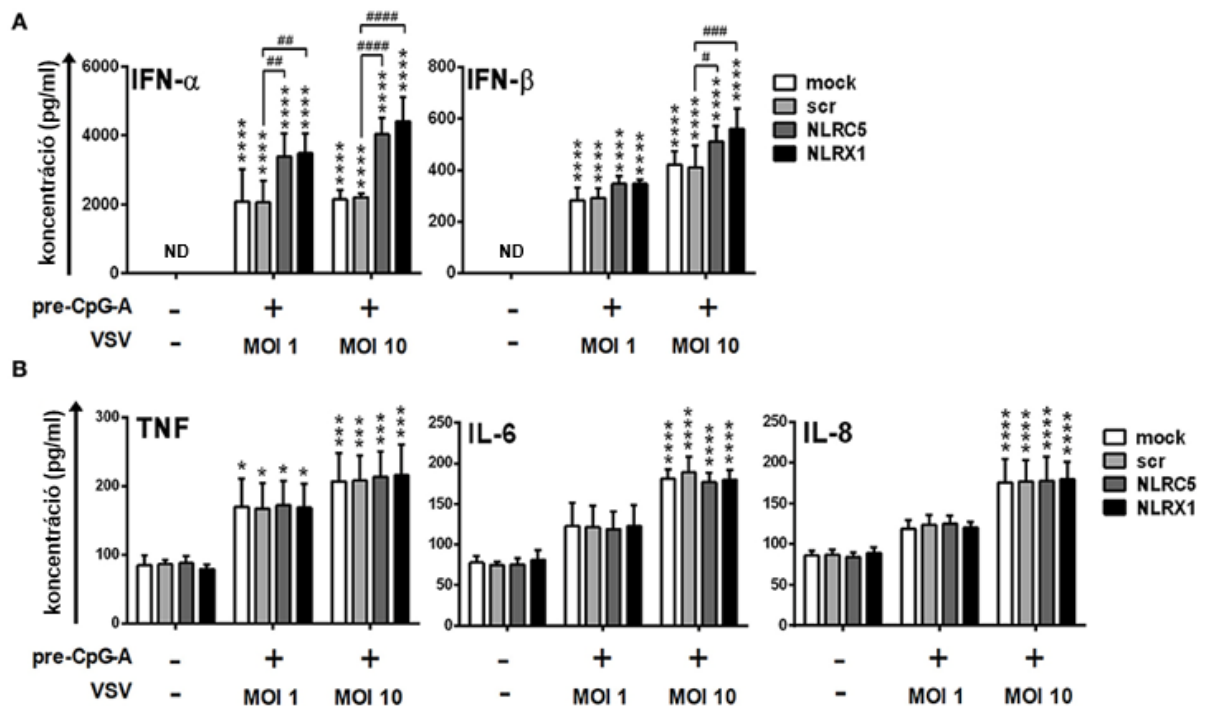


23. ábra. Az NLRX1 negatívan szabályozza a RIG-I/MDA5 agonista indukált I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus citokin választ humán moDS-ekben, míg az NLRC5 nincs hatással rá. A jelzett siRNS-ekkel transzfektált moDS-eket a RIG-I/MDA5 ligandum polyI:C-vel (1 μ g/ml) stimuláltuk (A-D). Az IFN- α , IFN- β (A), TNF, IL-6 és IL-8 (B) fehérjék szintjét 24 óra elteltével ELISA-val vizsgáltuk. Az I κ B α degradációjának kinetikáját western blottal határoztuk meg (C,D). A (C) pelen egy reprezentatív blot látható. Az oszlopdiagramok az I κ B α normalizált denzitását mutatják a stimuláció 60. percében (D). Az adatok 4 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják, a statisztikai elemzéshez pedig egyutas ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztet végeztünk (A,B,D). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ vs. kezeletlen vagy scr; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$. ND: nem detektálható, scr: scrambled.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az NLRX1 negatívan szabályozza az RLR-mediált antivirális IFN, illetve pro-inflammatórikus válaszokat is a moDS-ekben, míg az NLRC5-nek valószínűleg nincs szabályozó szerepe ezekben a folyamatokban ezen DS altípus esetében.

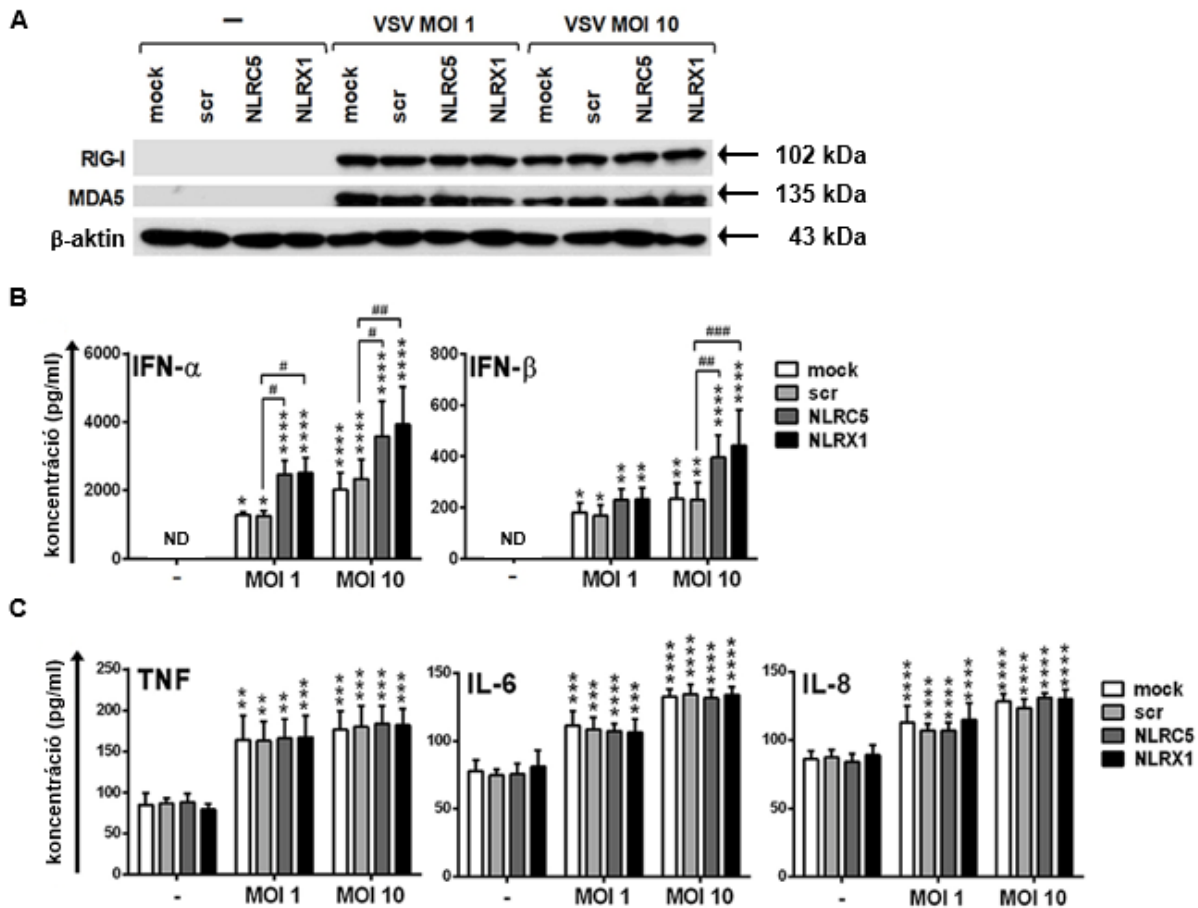
V.1.6 Az NLRC5 és az NLRX1 szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek vírusfertőzésre adott antivirális és pro-inflammatórikus válasza során

Hogy a szintetikus RLR agonistákkal végzett vizsgálataink eredményeit megerősítsük, illetve modellezni tudjuk az NLR-ek szerepét vírusfertőzés során, élő RNS vírussal is megfertőztük a GEN2.2 sejteket és a moDS-eket. A GEN2.2 sejtek esetében a transzfeekciót követően CpG-A előkezelést alkalmaztunk az RLR-ek kifejeződésének indukciójához, majd a sejteket VSV-vel (MOI 1 vagy MOI 10) aktiváltuk 18 órán keresztül és ezt követően vizsgáltuk a sejtek citokin szekrécións profilját. Az 5'ppp-dsRNS és a polyI:C szintetikus ligandumokhoz hasonlóan a GEN2.2 sejtek VSV-indukált I-es típusú IFN termelését mind az NLRC5, mind az NLRX1 csendesítése fokozta (**24. A ábra**), míg a pro-inflammatórikus citokinek termelését nem befolyásolta egyik NLR deplécións sem (**24. B ábra**).



24. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 hiánya fokozza a VSV-vel fertőzött GEN2.2 sejtek I-es típusú IFN termelését, de nem befolyásolja a pro-inflammatorikus citokinek és kemokinek termelését. A sejteket NLRC5, illetve NLRX1 specifikus vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNS-ekkel transzfektáltuk 24 órány keresztül (A,B). A csendesítés után a sejteket 0,25 μ M CpG-A-val (pre-CpG-A) kezeltük elő 16 órány át, hogy indukáljuk az RLR-ek citoszolikus expresszióját (A,B). Alapos mosási lépéseket követően a sejteket VSV-vel (MOI 1, MOI 10) fertőztük meg. Az IFN- α , IFN- β (A), TNF, IL-6 és IL-8 (B) fehérjék szintjét ELISA-val vizsgáltuk 18 órány elteltével. Az adatok 4 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják, a statisztikai elemzéshez pedig egyutas ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kezeletlen; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$. ND: nem detektálható, MOI: fertőzési multiplicitás, VSV: vezikuláris stomatitis vírus.

Mivel eredményeink azt mutatták, hogy a CpG-A előkezeléshez hasonlóan önmagában a VSV fertőzés is képes fokozni a RIG-I és az MDA5 expresszióját a GEN2.2 sejtekben (**25. A ábra**), megvizsgáltuk a CpG-A-val előzetesen nem előkezelt NLRC5 vagy NLRX1 csendesített GEN2.2 sejtek VSV-indukált citokin válaszait is (**25. B,C ábra**). Ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítés hatásai függetlenek a CpG-A előkezeléstől, mivel a nem előkezelt, csak VSV-vel fertőzött GEN2.2 sejtek esetében is hasonló változásokat tapasztaltunk a sejtek citokin szekréciós profiljában az NLRC5 vagy az NLRX1 depléciót követően (**25. B,C ábra**). Ezek alapján elmondható, hogy az NLRC5 és az NLRX1 is negatív szabályozója lehet a humán pDS-ek RLR-indukált I-es típusú IFN válaszányak, viszont nem játszanak szerepet a pDS-ek RLR aktiváció mediált pro-inflammatorikus citokin és kemokin válaszányban.

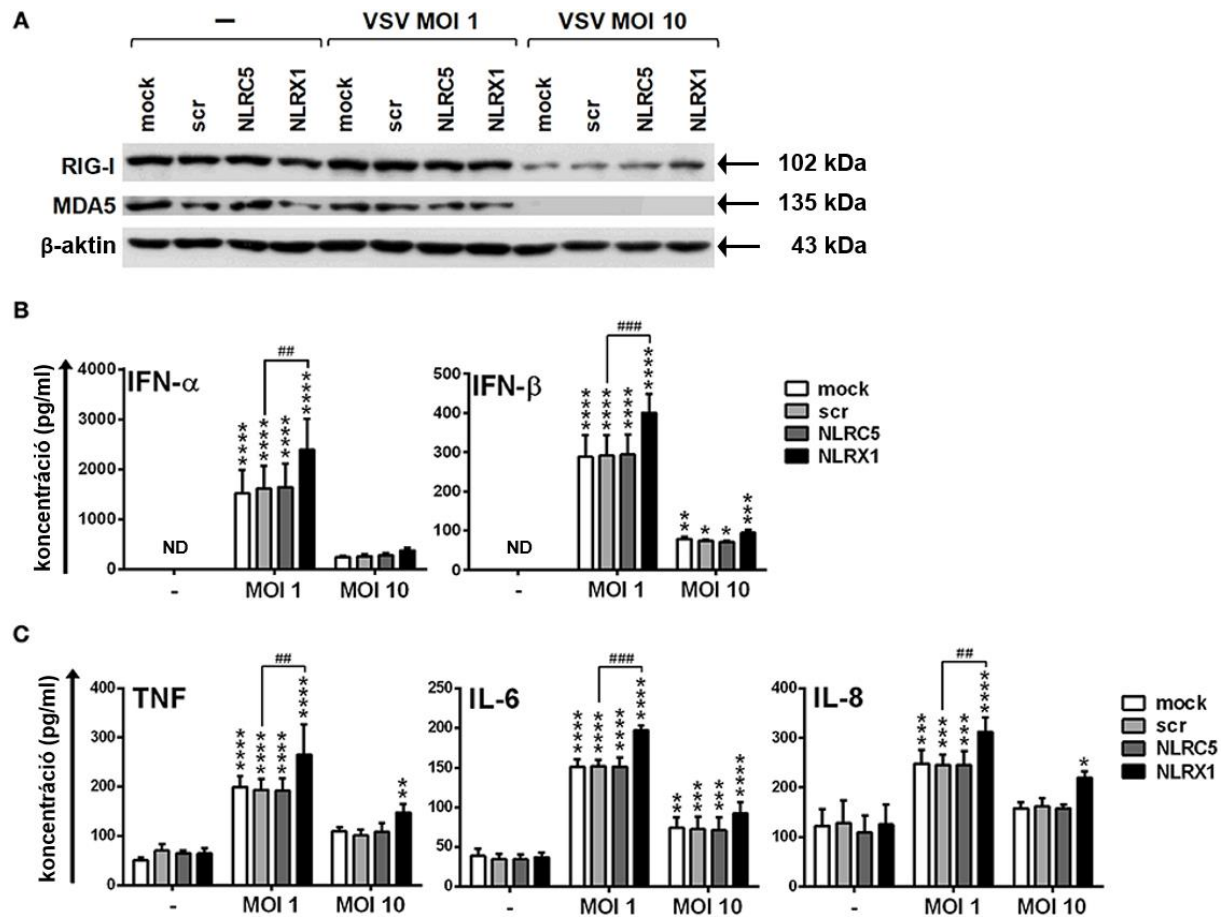


25. ábra. Az NLRC5 vagy az NLRX1 hiánya CpG-A előkezelés nélkül is fokozza a VSV-vel fertőzött GEN2.2 sejtek I-es típusú IFN termelését, de nem befolyásolja az NF-κB útvonal aktivitását. A sejteket NLRC5, illetve NLRX1 specifikus vagy scrambled (scr, negatív kontroll) siRNA-ekkel transzfektáltuk 24 órán keresztül (A-C). A GEN2.2 sejteket a transzfekció után CpG-A előkezelés nélkül is stimuláltuk VSV-vel (MOI 1, MOI 10), majd a RIG-I és MDA5 fehérjék szintjét western blot segítségével vizsgáltuk 24 óra múlva (A). Az IFN-α, IFN-β (B), TNF, IL-6 és IL-8 (C) fehérjék koncentrációját ELISA-val vizsgáltuk a csak VSV-vel fertőzött sejtek felülcsúszójából. Az (A) panelen egy reprezentatív blot látható. Az adatok 4 független kísérlet átlagát ± SD értékét mutatják, a statisztikai elemzéshez pedig egyutas ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 vs. kezeletlen; #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001. ND: nem detektálható, MOI: fertőzési multiplicitás, VSV: vezikuláris stomatitis vírus.

A moDS-ek esetében a RIG-I és az MDA5 expresszióját nem befolyásolta a VSV-fertőzés az alacsonyabb vírus koncentráció esetén (MOI 1), míg a magasabb dózis (MOI 10) már jelentős csökkenéshez vezetett (26. A ábra), mely arra utalhat, hogy a moDS-ek jóval érzékenyebbek lehetnek a vírus citopátiás hatására, mint a GEN2.2 sejtek. Az 5'ppp-dsRNA és a polyI:C szintetikus ligandumokhoz hasonlóan a VSV alacsony koncentrációban alkalmazva (MOI 1) I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus citokin termelést indukált, melyet az NLRX1 depléciója fokozott, az NLRC5 hiánya pedig nem befolyásolt (26. B,C ábra). Érdekes módon a GEN2.2 sejtekkel ellentétben a moDS-ek VSV-vel szemben tanúsított érzékenységét feltehetően az is bizonyítja, hogy a VSV nagyobb koncentrációja (MOI 10) már nem váltott ki

fokozott citokin termelést a kontroll mintákhoz képest (26. B,C ábra), ami a RIG-I és az MDA5 expresszió VSV-indukált csökkenésével magyarázható (26. A ábra).

Eredményeinket összefoglalva elmondható, hogy az NLRX1 és az NLRC5 is képes lehet szabályozni az RLR-mediált I-es típusú IFN, illetve pro-inflammatorikus válaszokat humán DS-ekben, ugyanakkor szabályozó szerepük sejtspecifikus lehet.



26. ábra. Az NLRX1 negatívan szabályozza a VSV-indukált I-es típusú IFN és pro-inflammatorikus választ humán moDS-ekben, míg az NLRC5 nincs hatással rá. Az ábrán jelzett siRNS-ekkel transzfektált moDS-eket VSV-vel (MOI 1, MOI 10) kezeltük (A-C). 18 óra elteltével a RIG-I és az MDA5 (A) fehérjék szintjét western blotlaltal, a szekretált IFN-α, IFN-β (B), TNF, IL-6 és IL-8 (C) koncentrációját pedig ELISA-val határoztuk meg. Az (A) panelon egy reprezentatív blot látható. Az adatok 4 független kísérlet átlagát ± SD értékét mutatják, a statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk (B,C). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 ****p < 0,0001 vs. kezeletlen; ###p < 0,01, ####p < 0,001. ND: nem detektálható, MOI: fertőzési multiplicitás, VSV: vezikuláris stomatitis vírus, scr: scrambled.

V.2 Az I-es típusú IFN útvonal és az NLRP3-függő IL-1 β szekréciónak útvonal kölcsönhatásainak feltárása humán pDS-ekben

V.2.1 Az NLRP3 inflammaszóma komponensek expressziójának vizsgálata aktiválatlan és aktivált humán GEN2.2 pDS sejtvonalon

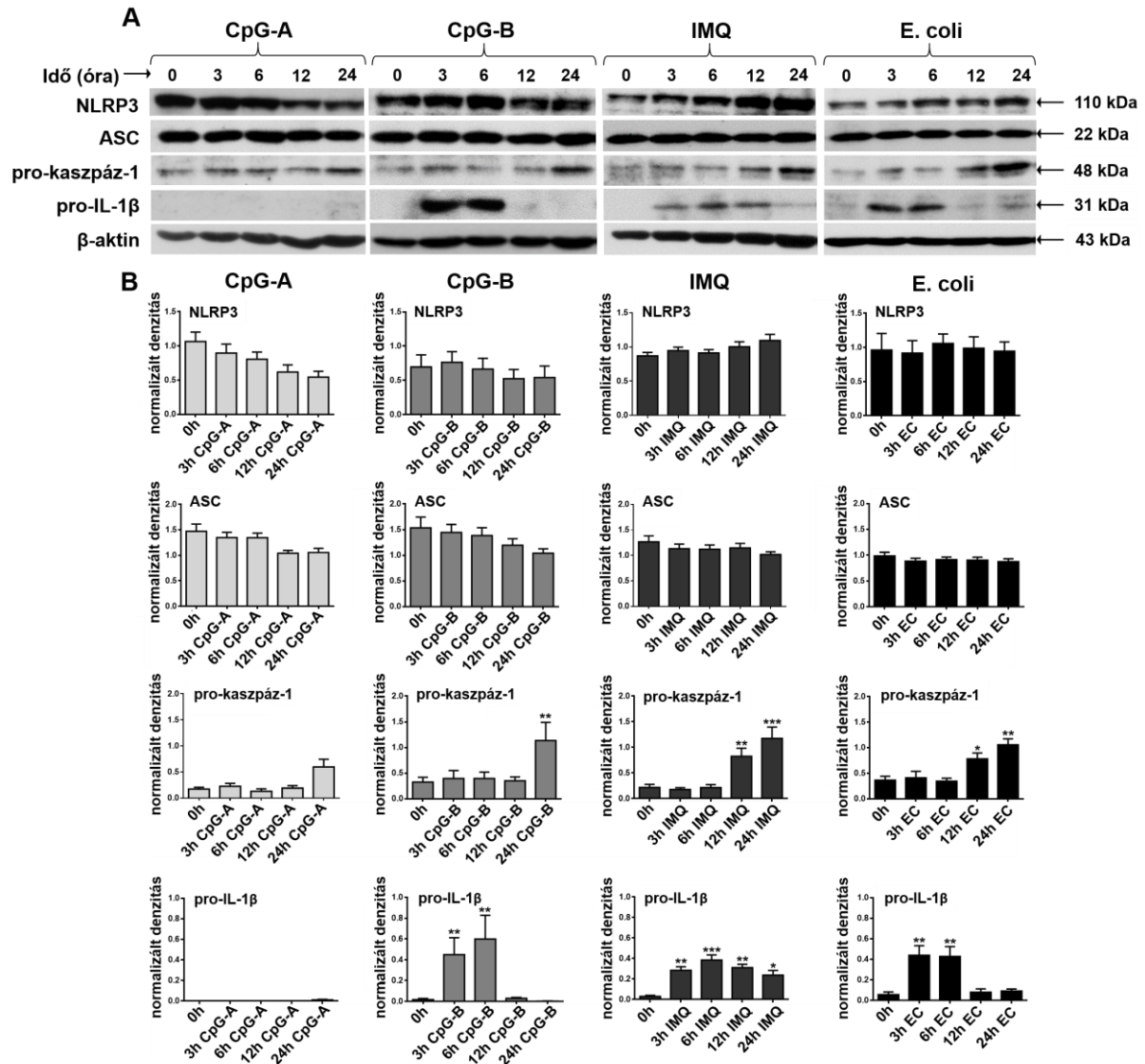
Először a GEN2.2 sejtekben térképeztük fel az NLRP3 inflammaszóma komponensek alapszintű, illetve aktiváció indukált kifejeződésének kinetikáját protein szinten western blot módszer segítségével. A sejteket kezeletlenül hagytuk vagy szintetikus TLR ligandokkal kezeltük és mértük az NLRP3, ASC, pro-kaspáz-1 és pro-IL-1 β szinteket (27. A,B ábra).

Eredményeink alapján az NLRP3 receptor, valamint adaptor fehérjéje az ASC, illetve a pro-kaspáz-1 alapszinten, aktiváció nélkül is detektálható a GEN2.2 sejtekben (27. A,B ábra), ugyanakkor a pro-IL-1 β csak nagyon kis mértékben fejeződik ki a sejtekben aktivációs szignál nélkül (27. A,B ábra). Amikor a GEN2.2 sejteket különböző, endoszómális TLR receptorok szintetikus ligandjaival aktiváltuk, azt tapasztaltuk, hogy a különböző aktivátorok eltérő módon befolyásolják az NLRP3 inflammaszóma komponensek expressziós szintjét. A TLR9 liganddal, CpG-A-val aktivált pDS-ekben az NLRP3 expresszió nem szignifikáns módon csökkent (27. A,B ábra), viszont CpG-B kezelés esetén nem változott a szintje. Az NLRP3 expressziót a TLR7 ligand, az Imiquimod sem befolyásolta. Az NLRP3 receptor adaptor proteinjének, az ASC-nek az expressziójában protein szinten nem detektáltunk szignifikáns változást egyik aktivátor esetében sem (27. A,B ábra). Viszont hosszabb, 24 órás inkubációs időket alkalmazva a CpG-B és az Imiquimod kezelés is szignifikánsan fokozta a pro-kaspáz-1 kifejeződést a sejtekben (27. A,B ábra). A legnagyobb különbséget a két TLR9 ligand, a CpG-A és a CpG-B pro-IL-1 β termelődést indukáló képességében tapasztaltuk. Habár a két ODN szekvencia azonos receptoron keresztül hat, a pDS-ekben a CpG-A főként a korai endoszómákban ismerődik fel és IRF-függő I-es típusú IFN szekréciónak eredményez, míg a késői endoszómákban felismerődő CpG-B az NF- κ B útvonal aktivátoraként, leginkább pro-inflammatórikus citokin termelést indukál az IFN indukció helyett [249]. A CpG-B a korai inkubációs időpontokban, azaz 3 és 6 óránál nagymértékben indukálta a pro-IL-1 β termelődését a pDS-ekben, ezzel szemben a CpG-A kezelés egyáltalán nem indukált IL-1 β expressziót (27. A,B ábra). Imiquimoddal aktiválva a sejteket a pro-IL-1 β expresszió nemcsak 3 és 6 óránál, hanem a későbbi időpontokban, 12 és 24 óránál is szignifikánsan magasabb volt a pDS-ekben a kezeletlen sejtekhez képest (27. A,B ábra).

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az NLRP3 inflammaszómák aktiválódása révén létrejövő gyulladáshoz vezető válasz nagy jelentőséggel bír a bakteriális és a gombás fertőzések leküzdésében. Számos baktérium, illetve a baktériumokból felszabaduló anyagok - mint például

a különböző bakteriális toxinok - kiváló priming szignált biztosítanak az inflammaszómák számára [250]. Így további kísérleteinkben a pDS-eket szintetikus TLR ligandumok helyett élő baktériumokkal és gombákkal is aktiváltuk (**27. A,B ábra**). A patogén *E. coli* mellett két nem patogén Gram pozitív baktérium (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus rhamnosus*) és egy opportunist gomba (*Candida albicans*) fajt is használtunk aktivációs szignálként. Kísérleteink során az *E. coli* bizonyult a legjobb aktivátornak, így csak ezt mutatjuk be a **27. ábrán**. Az *E. coli* kezelés esetén hasonló aktivációs profilt figyeltünk meg a GEN2.2 sejteknél, mint a CpG-B és az Imiquimod stimuláció hatására. *E. coli* kezelést követően a pro-IL-1 β indukció a korai inkubációs időpontoknál, azaz 3 és 6 óránál volt megfigyelhető, míg a pro-kaspáz-1 kifejeződés a kezelések későbbi időpontjaiban, 12 és 24 óránál volt szignifikánsan emelkedett. Ugyanakkor az NLRP3 és ASC fehérjék szintjét a baktérium expozíció nem befolyásolta (**27. A,B ábra**).

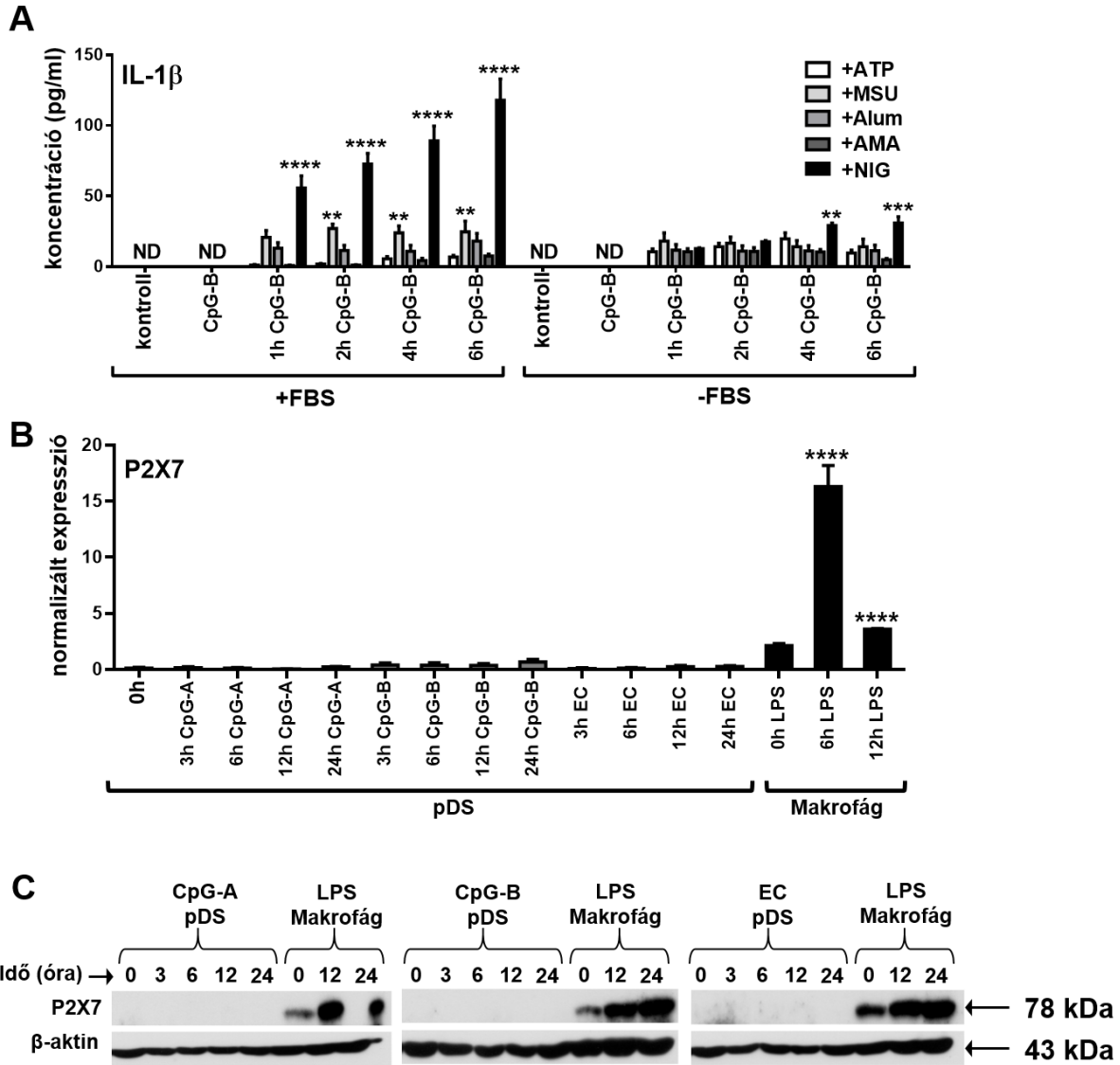
Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a különböző aktivációs szignálok eltérő IL-1 β termelődési kinetikát eredményeznek a pDS-ekben, illetve a pro-IL-1 β protein szinten az aktivációt követő 3 órán belül, tehát igen korai időpontban már detektálható a sejtekben.



27. ábra. A különböző aktivációs szignálok eltérő módon indukálják az NLRP3 inflammaszóma komponensek expresszióját a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-A-val, 1 μ M CpG-B-vel, 5 μ g/ml IMQ-val vagy *E. coli*-val (MOI 10) kezeltük időfüggő módon (A-B). Az NLRP3, az ASC, a pro-kaspáz-1 és a pro-IL-1 β fehérjék szintjét western blottal vizsgáltuk. A reprezentatív blotok az (A) panelen láthatóak. A (B) panelen 5 független kísérlet átlaga \pm SD értéke van feltüntetve. Az adatok statisztikai elemzéséhez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. 0h. IMQ: imiquimod, EC: *Escherichia coli*.

V.2.2 A GEN2.2 humán pDS sejtvonal érett IL-1 β szekréciójához szükséges aktivációs szignálok azonosítása

Miután megállapítottuk, hogy a pro-IL-1 β termelődést leginkább erős NF- κ B útvonal aktivátorok, úgymint a CpG-B képes indukálni a GEN2.2 sejtekben, a következő lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy a pDS-ek képesek-e hasítani és átalakítani az inaktív, éretlen fehérjét annak bioaktív, érett formájává. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációjához a legtöbb sejttypusban két jel szükséges, egy elsődleges „priming” szignál és egy másodlagos aktivációs szignál [146]. A másodlagos szignál biztosítja az NLRP3 inflammaszóma összeszerelődését és az inflammaszóma aktivációján keresztül a pro-kaspáz-1 hasítódását. Az aktivált enzim ezután hasítja a pro-IL-1 β -t, ami így éretté válik és a sejt szekretálhatja [251]. Az NLRP3 inflammaszóma összeszerelődését számtalan másodlagos szignál képes indukálni. Ezek lehetnek saját vagy idegen eredetű DAMP-ok, illetve különböző PAMP-ok is [195]. Kísérleteink során a CpG-B-vel 3 óráig előkezelt sejtekben másodlagos aktivációs szignálként ATP-t, MSU-t, alumínium-hidroxidot, nigericint, illetve a mitokondriális ROS termelést fokozó AMA-t alkalmaztunk [215]. A másodlagos aktivációs szignálokkal történő kezelést követően 1, 2, 4 és 6 óra elteltével ELISA módszerrel vizsgáltuk a szekretált, érett IL-1 β koncentrációját a sejtek felülúszójában FBS tartalmú médiumban. Ugyanakkor a kísérleteket FBS nélküli médiumban is elvégeztük, mivel a szérumban megtalálható szolubilis ekto-ATPázok gyorsan képesek az ATP-t hidrolizálni (**28. A ábra**). Önmagában a CpG-B-vel történő TLR aktiváció az IL-1 β hasított formájának létrehozásához nem volt elegendő a sejteknek. Érdekes módon a pDS-ek esetében a vizsgált NLRP3 aktivátorok közül csak a kálium ionofórként működő bakteriális toxin, a nigericin [252] bizonyult erőteljes másodlagos szignálnak (**28. A ábra**). Az NLRP3 inflammaszóma aktivitásban kiemelkedő makrofágok esetében az ATP az egyik leghatásosabb NLRP3 aktivátor [253], viszont a GEN2.2 sejtvonalban az ATP nem eredményezett IL-1 β szekréciót. Ez arra ösztönzött minket, hogy megvizsgáljuk az ATP felismerésére szolgáló P2X7 receptor expresszióját a pDS-ekben. Eredményeink alapján a pDS-ek a makrofágokkal szemben nem fejezik ki a P2X7 receptort és aktiváció hatására sem fokozódik a receptor expressziója sem RNS (**28. B ábra**), sem protein szinten a sejtekben (**28. C ábra**), mely magyarázhatja, hogy a pDS-ekben ATP jelenlétében miért nem tapasztaltunk NLRP3 inflammaszóma aktivációt. Mivel az általunk vizsgált másodlagos szignálok közül csak a nigericin indukálta szignifikáns módon az IL-1 β hasított formájának megjelenését a sejtek felülúszójában, a további kísérleteinkben ezt a bakteriális toxint alkalmaztunk másodlagos szignálként.

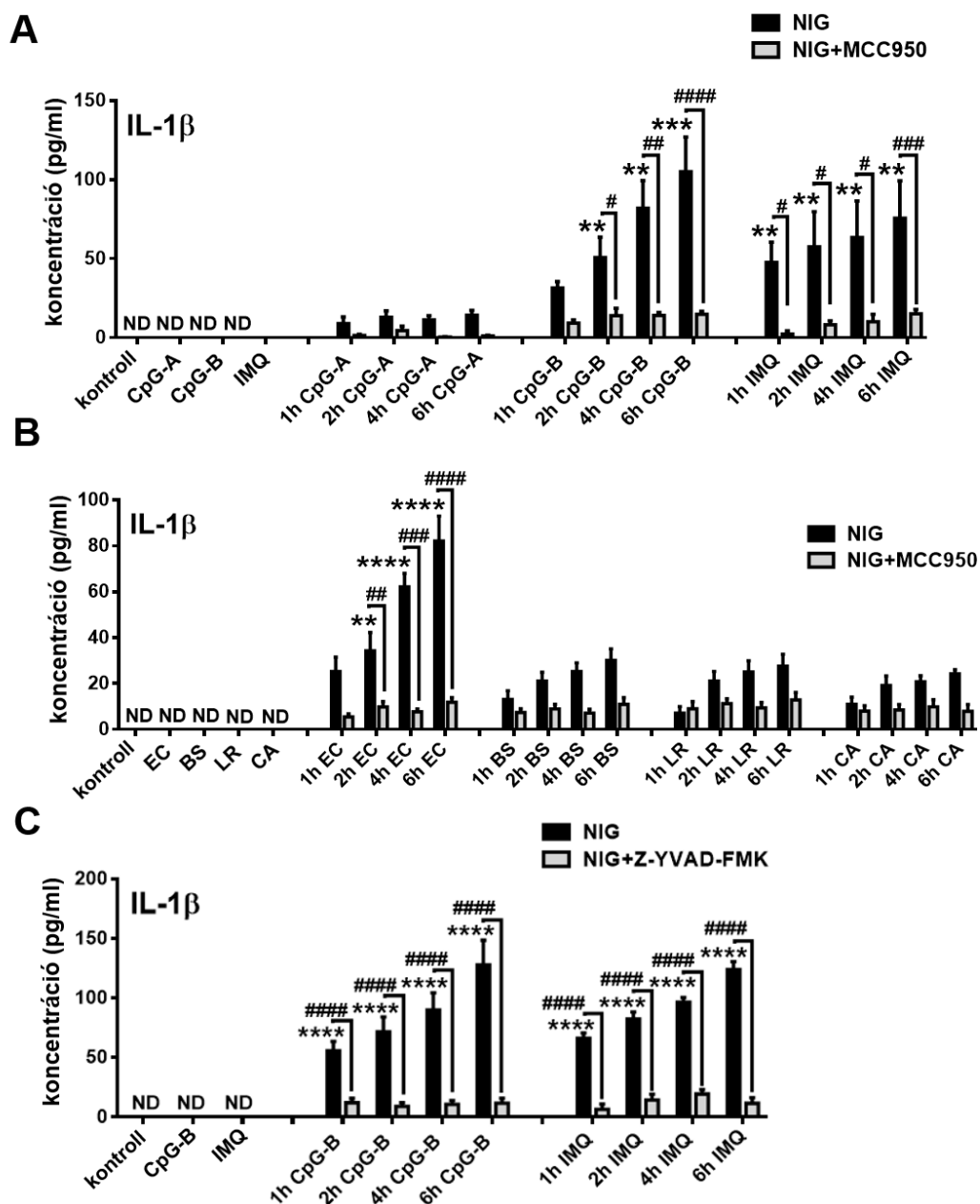


28. ábra. A nigericin a leghatékonyabb másodlagos szignál az NLRP3 aktiválásához a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-B-vel stimuláltuk 3 órán keresztül FBS-t tartalmazó vagy FBS nélküli médiumban, majd hogy aktiváljuk az NLRP3 inflammaszómát a sejteket 5 mM ATP, 300 μ g/ml MSU, 250 μ g/ml alumínium-hidroxid, 0,5 μ g/ml AMA vagy 20 μ M nigericin jelenlétében inkubáltuk időfüggő módon (A). A szekretált IL-1 β koncentrációját ELISA-val határoztuk meg (A). Egy másik kísérletben a GEN2.2 sejteket CpG-A-val (1 μ M), CpG-B-vel (1 μ M) vagy *E. coli*-val (MOI 10) kezeltük, míg a primer makrofágokat LPS-sel (250 ng/ml) aktiváltuk időfüggő módon (B-C). A P2X7 receptor expresszióját mRNA szinten Q-PCR segítségével határoztuk meg (B). A reprezentatív blotokon a P2X7 fehérjeszintje látható western blot módszerrel meghatározva (C). A grafikonok 4 független kísérlet átlagát \pm SD értékét ábrázolják. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll. Alum: alumínium-hidroxid, AMA: antimycin A, ATP: adenzin-trifoszfát, EC: *Escherichia coli*, FBS: fétális szarvasmarha szérum, LPS: lipopoliszacharid, MSU: mononátrium-urát, ND: nem detektálható, NIG: nigericin, pDS: plazmacitoid dendritikus sejt.

A CpG-B-vel történő priminghoz hasonlóan az Imiquimod előkezelés is szignifikáns, érett IL-1 β szekréciót eredményezett nigericin jelenlétében, ugyanakkor a CpG-A kezelés, mely a korábbi kísérleteinkben sem indukálta az IL-1 β pro-formáját, nigericinnel együtt alkalmazva sem bizonyult az NLRP3 útvonalat aktiváló szignálnak **(29. A ábra)**.

Az alkalmazott mikrobiális stimulusok közül csak a patogén *E. coli* indukált érett IL-1 β szekréciót nigericin jelenlétében, míg a *Bacillus subtilis*, a *Lactobacillus rhamnosus* és a *Candida albicans* aktiváció esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást **(29. B ábra)**. Megjegyzendő, hogy miként önmagában a szintetikus TLR ligandokkal történő előkezelés sem volt elegendő a pDS-ek esetében a hasított IL-1 β előállításához **(29. A ábra)**, úgy önmagukban a mikrobák sem indukálták a citokin hasított formájának a szekrécióját **(29. B ábra)**.

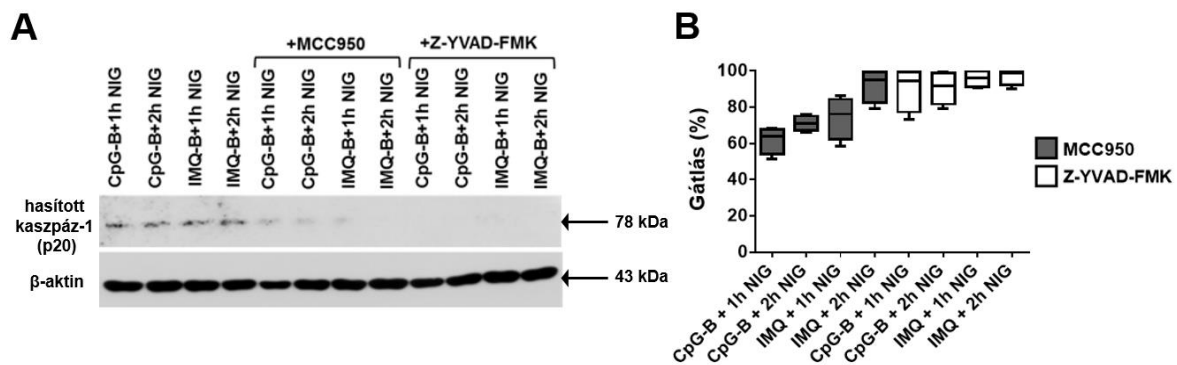
Hogy meghatározzuk a pDS-ek IL-1 β szekréciója valóban NLRP3 inflammaszóma függő folyamat-e, kísérleteinket elvégeztük a specifikus NLRP3 inhibitor, az MCC950 molekula jelenlétében is. Mivel a pDS-ek IL-1 β szekréciója a specifikus NLRP3 inhibitor jelenlétében gátolható volt **(29. A,B ábra)**, elmondható, hogy a pDS-ek érett IL-1 β termelése főként NLRP3-függő módon valósult meg a priming és a másodlagos aktivációs szignálok együttes hatására. Ezután hogy kiderítsük a pDS-ekben az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása kaszpáz-1 függő-e, az enzim specifikus inhibitorával, a Z-YVAD-FMK molekulával kezeltük a sejteket a primingot követően, a nigericin kezelés előtt. A kaszpáz-1 specifikus gátlószere szignifikánsan csökkentette a CpG-B-vel és az Imiquimoddal előkezelt pDS-ek nigericin indukált IL-1 β szekrécióját **(29. C ábra)**.



29. ábra. A GEN2.2 pDS sejtvonal IL-1 β szekréciója csak másodlagos aktivációs szignál jelenlétében valósul meg és specifikus NLRP3 és kaszpáz-1 inhibitorokkal gátolható. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-A-val, 1 μ M CpG-B-vel vagy 5 μ g/ml IMQ-val kezeltük elő 3 óráig, majd 20 μ M nigericint adtunk a sejtekhez időfüggő módon (A). Párhuzamos kísérletekben a sejteket 1 μ M MCC950 (specifikus NLRP3 inhibitor) jelenlétében inkubáltuk a TLR stimuláció utolsó 30 percében a nigericin expozíció előtt (A). Hasonló kísérletekben a GEN2.2 sejteket élő *E. coli*-val (MOI 10), *Bacillus subtilis*-szel (MOI 10), *Lactobacillus rhamnosus*-szal (MOI 10) és *Candida albicans*-szal (MOI 0,01) kezeltük 3 óráig, majd ezt követően időfüggő módon 20 μ M nigericinnel aktiváltuk a sejteket 1 μ M MCC950 jelenlétében vagy anélkül (B). További kísérletekben a GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-B-vel vagy 5 μ g/ml IMQ-val aktiváltuk 3 órán keresztül, majd 20 μ M nigericin jelenlétében inkubáltuk őket időfüggő módon, egyes esetekben pedig a TLR stimuláció utolsó 30 percében, a nigericin expozíciót megelőzően 20 μ M Z-YVAD-FMK-val (a kaszpáz-1 specifikus inhibitora) kezeltük a sejteket (C). Az érett IL-1 β koncentrációját ELISA-val határoztuk meg (A-C). A grafikonok 6 független kísérlet átlagát \pm SD értékét ábrázolják. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$, ##### $p < 0,0001$. BS: *Bacillus subtilis*, CA: *Candida albicans*, EC: *Escherichia coli*, IMQ: imiquimod, LR: *Lactobacillus rhamnosus*, ND: nem detektálható, NIG: nigericin.

Továbbá mindkét gátlószer alkalmazása esetén jelentős mértékben csökkent a kaszpáz-1 hasítódása során keletkező p20 alegység szintje, mely arra utal, hogy a GEN2.2 sejtvonalban az érett IL-1 β szekréciónak valóban szükséges az NLRP3 inflammaszóma aktivációja, ami a pro-kaspáz-1 hasításához vezet (**30. A,B ábra**).

Tehát a pDS sejtvonalon végzett kísérleteink eredményei alapján elmondható, hogy a humán pDS-ek esetében csak a megfelelő primingot és másodlagos aktivációs szignált együtt alkalmazva indukálható az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása és ezáltal az IL-1 β citokin érett formájának a létrehozása.



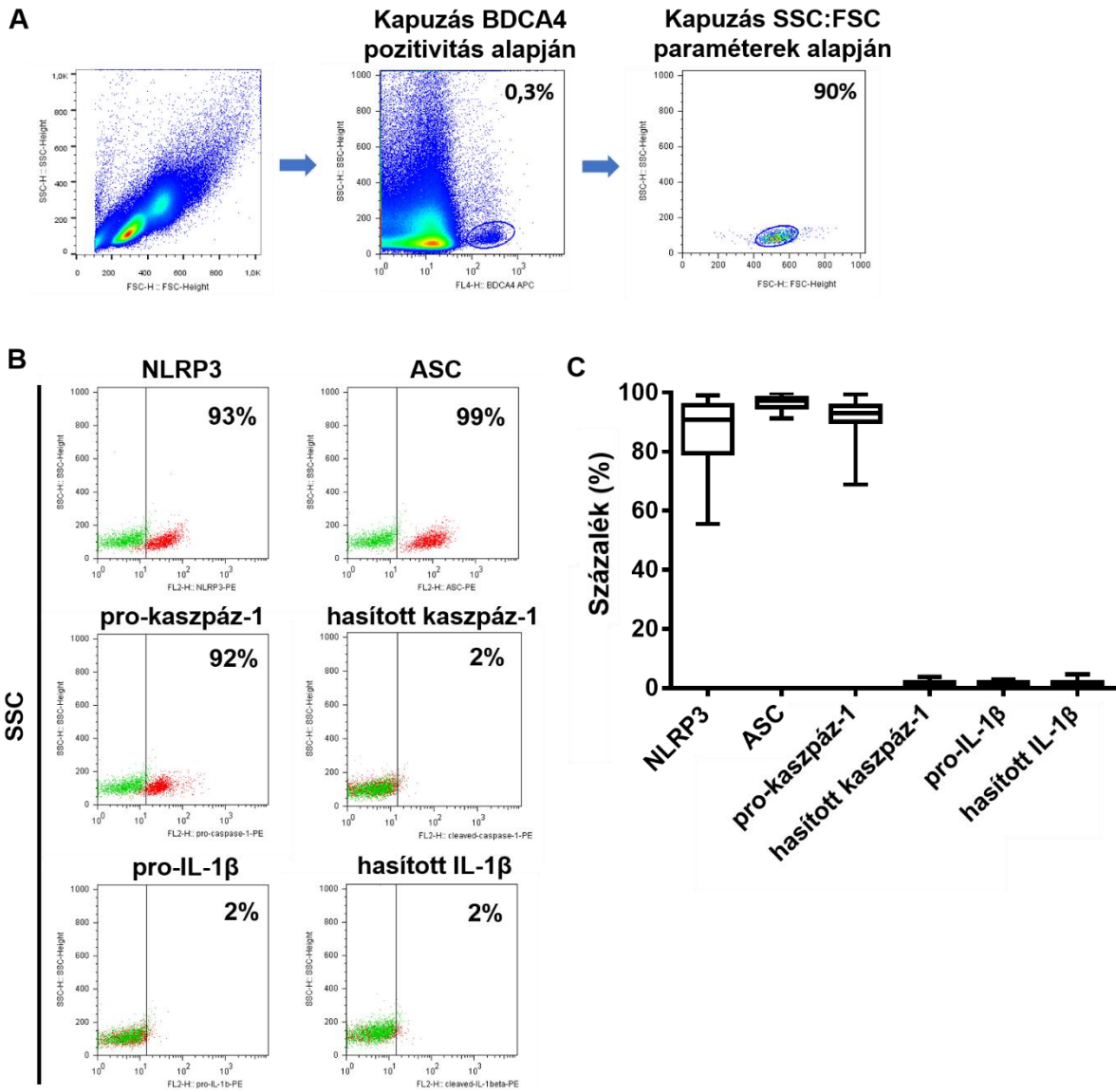
30. ábra. A hasított kaszpáz-1 szintje csökken az inflammaszóma komponenseket gátló szerek hatására a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-B-vel vagy 5 μ g/ml IMQ-val 3 óráig előkezeltük, majd a TLR stimuláció utolsó 30 percére 1 μ M MCC950 vagy 20 μ M Z-YVAD-FMK gátlószerrel kezeltük a sejteket. Ezután 20 μ M nigericinnel inkubáltuk őket 1 vagy 2 órán keresztül és a hasított kaszpáz-1 (p20) szintjét western blot módszerrel határoztuk meg (A, B). Az ábra bal oldalán egy reprezentatív blot látható (A), illetve a diagramon az MCC950 és a Z-YVAD FMK által kiváltott gátlás százalékos arányát ábrázoltuk (B). A grafikonon 6 független kísérlet átlagát \pm SD értékét ábrázolja. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. IMQ: imiquimod, NIG: nigericin.

V.2.3 Az NLRP3 útvonal aktivitásának vizsgálata primer humán pDS-ekben

Miután a GEN2.2 humán pDS sejtvonalon feltérképeztük az NLRP3 útvonal komponenseinek expresszióját és meghatároztuk a legerőteljesebb aktivációs szignálok kombinációját, kíváncsiak voltunk arra, hogy a primer humán pDS-ek esetében is hasonló aktivációs profilt látunk-e. Kísérleteinkhez egészséges véradóktól perifériás vért gyűjtöttünk, majd a vérmintákból Ficoll Paque Plus gradiens centrifugálással kinyertük a PBMC-ket. Ezután sejtfelszíni, valamint intracelluláris festést alkalmazva áramlási citometriával vizsgáltuk az NLRP3 útvonal komponensek expresszióját a kikapuzott pDS sejtpopuláción. A pDS sejtpopuláció meghatározásakor először az SSC parameter és a BDCA4 pozitivitás alapján jelöltük ki a pDS populációt, mely körülbelül a 200-as SSC érték alatt mutatott egységes populációt BDCA4 pozitivitással (**31. A ábra**). Mivel a BDCA4 pozitív populáció az SSC-FSC paraméterek alapján nem alkotott egységes populációt, így egy második kapuzást is

alkalmaztunk. Ennek során a BDCA4 populáción belül azt az egységes sejtpopulációt kapuztuk ki, mely a 200-as SSC érték alá és a 400-600-as FSC értékek közé esett **(31. A ábra)**. A továbbiakban az így kikapuzott pDS populáción végeztük el a fenotípusos analízist.

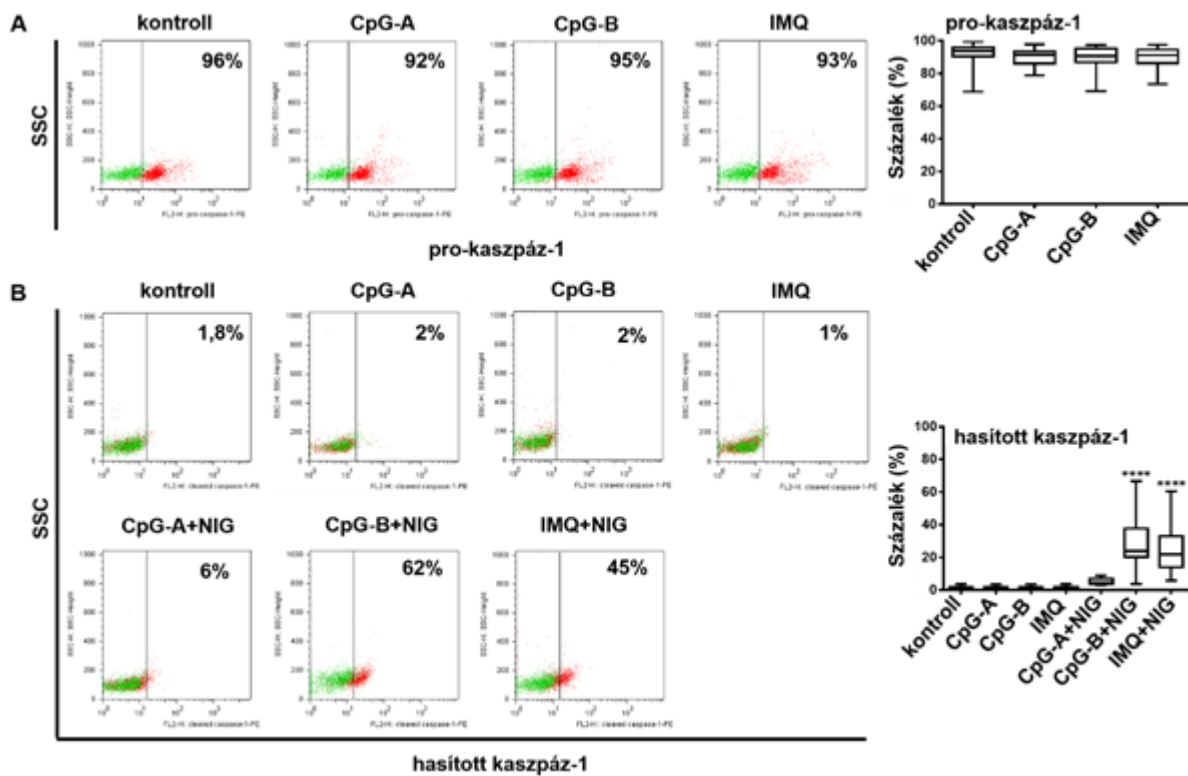
Elsőként megvizsgáltuk az NLRP3 útvonal komponensek kifejeződését egészséges véradóktól származó mintákban és azt találtuk, hogy az NLRP3 receptor, az NLRP3 adaptor fehérjéje, az ASC és a pro-kaspáz-1 enzim is alapszinten kifejeződik majdnem a teljes pDS populációban **(31. B ábra)**. Viszont míg az ASC fehérje szintje stabilan 95% felett volt az általunk vizsgált összes donorban, addig az NLRP3 és a pro-kaspáz-1 szintje donortól függően alacsonyabb expressziós értékeket is mutatott **(31. C ábra)**. Ugyanakkor aktivációs szignál nélkül a hasított kaspáz-1, a pro-IL-1 β és a hasított-IL-1 β expresszió elenyésző volt a sejtekben **(31. B,C ábra)**.



31. ábra. Az NLRP3 inflammaszóma komponensek alapszintű expressziója primer humán pDS-ekben. Az egészséges donorok perifériás véréből Ficoll Paque Plus gradiens centrifugálással kinyertük a PBMC-eket, ezután pedig BDCA4 sejtfelszíni jelölést és intracelluláris festést alkalmaztunk, majd a mintákat áramlási citometria segítségével analizáltuk (A-C). A pDS populáció meghatározása két lépésben történt. Először BDCA4-re kapuzva azonosítottuk a pDS-eket, majd egy második lépésben a 200-as SSC érték alá és a 400-600-as FSC érték közé eső sejteket kapuztuk ki (A). Az (A) panelen látható az alkalmazott kapuzási technika. Az NLRP3, az ASC, a pro-kaspáz-1, a hasított kaspáz-1, a pro-IL-1 β és a hasított IL-1 β expresszióját a kikapuzott pDS populáción intracelluláris festéssel vizsgáltuk (B, C). Reprezentatív dot plotok láthatóak a (B) panelen, a százalékok a pozitív sejtek arányát jelzik. A (C) panelen 22 donor átlagát \pm SD értékét ábrázoltuk. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t végeztünk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. FSC: előre irányuló fényszórás, SSC: oldalirányú fényszórás.

Ezután szintén áramlási citometriát alkalmazva megvizsgáltuk, hogy aktiváció hatására indukálható-e a primer pDS-ekben a kaspáz-1 hasított, illetve az IL-1 β citokin pro és hasított formája a GEN2.2 sejtvonalhoz hasonlóan. Az intracelluláris protein festést fehérje transzport gátló alkalmazása nélkül végeztük, mivel az IL-1 β szekréciója speciális, a Golgi útvonaltól független [254,255]. Emiatt több inkubációs időpontot is megvizsgálva, előzetes eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a TLR előkezelt sejtekben az 1 órás nigericin kezelés indukálja a legnagyobb mértékben detektálható hasított IL-1 β pozitívítást, ezért további kísérleteink során 1 órás nigericin stimulációt használtunk a primingot követően.

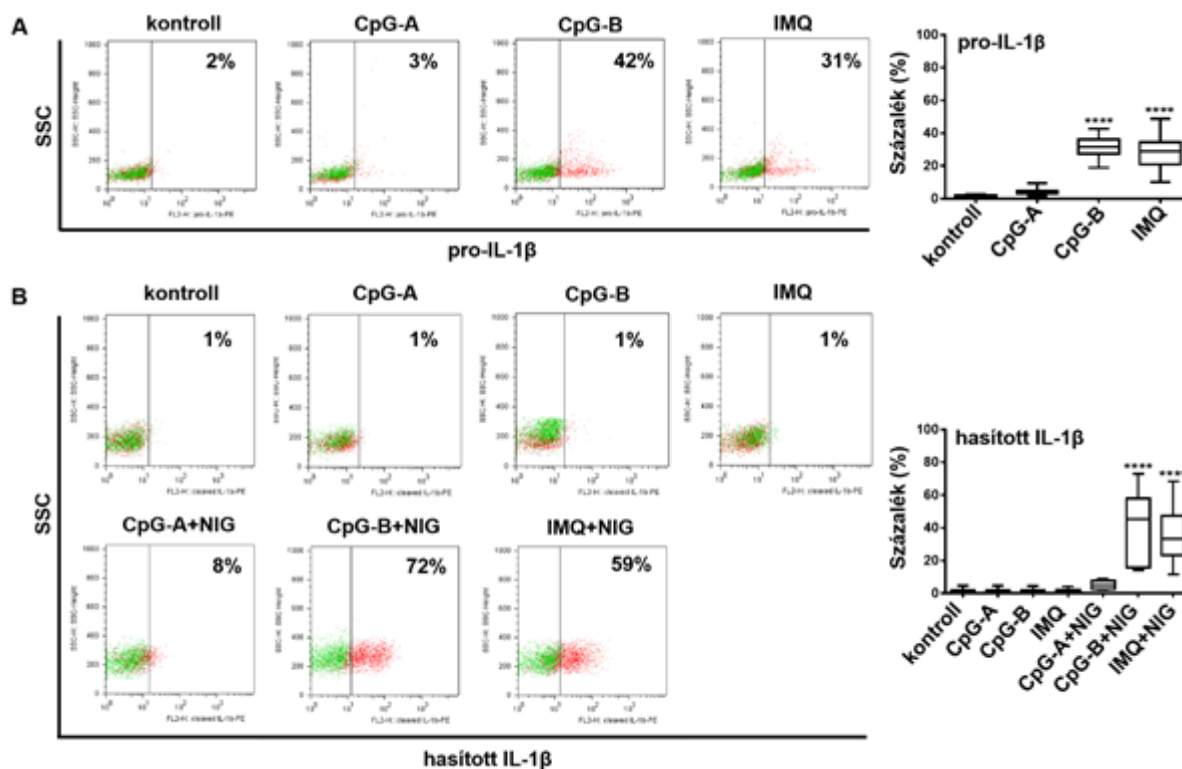
Eredményeink azt mutatták, hogy a TLR9 receptor két ligandja, a CpG-A és a CpG-B, valamint a TLR7 ligand Imiquimod a pro-kaspáz-1 szintjét nem befolyásolta szignifikánsan (**32. A ábra**) és önmagukban a kaspáz-1 hasított formáját sem voltak képesek indukálni (**32. B ábra**). Másodlagos szignállal, azaz nigericinnel együtt alkalmazva viszont a CpG-B és az Imiquimod is szignifikánsan növelte a hasított kaspáz-1 expressziót a sejtekben, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy indukáló képességük hatásfoka erősen donorfüggőnek bizonyult (**32. B ábra**).



32. ábra. A különböző TLR ligandok kaspáz-1 aktiváló képessége eltérő a primer humán pDS-ekben. PBMC-t izoláltunk egészséges donorok perifériás véréből, majd áramlási citometria segítségével vizsgáltuk az IL-1 β útvonal aktivitását a pDS populáción belül. A PBMC-t 1 μ M CpG-A-val, 1 μ M CpG-B-val vagy 5 μ g/ml IMQ-val előkezeltük 2,5 órán keresztül (A, B). A TLR előkezelés után 20 μ M nigericinnel aktiváltuk 1 órán keresztül a sejteket, hogy indukáljuk a kaspáz-1 hasítást (B). A pro-kaspáz-1 (A) és a hasított kaspáz-1 (B) pozitív sejtek százalékos arányát a pDS populáción belül intracelluláris festéssel határoztuk meg. A bal oldali reprezentatív dot plotok az (A, B) panelen láthatók, a százalékok a pozitív sejtek arányát jelzik. A grafikonokon 22 donor átlagát \pm SD értékét ábrázoltuk. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. **** $p < 0,0001$ vs. kontroll. IMQ: imiquimod, NIG: nigericin, SSC: oldalirányú fényszórás.

A pDS sejtvonalon megfigyeltékhez hasonlóan a primer pDS-ek esetében is a pro-IL-1 β és a hasított IL-1 β megjelenése főként CpG-B és Imiquimod előkezelés, illetve nigericin expozíció kombinációját követően detektálható (**33. A,B ábra**). Ezzel ellentétben a CpG-A mind a pro- és mind a hasított forma indukációjában gyenge aktivációs szignálnak bizonyult (**33. A,B ábra**). Az aktivációt követő IL-1 β indukció szintén donorfüggő volt (**33. A,B ábra**).

Eredményeink alapján elmondható, hogy a primer pDS-ekben is hasonló aktivációs szignálok kombinációja indukálja az NLRP3 inflammaszóma aktiválódását, mint amit a GEN2.2 humán pDS sejtvonal esetében eredményesen alkalmaztunk.



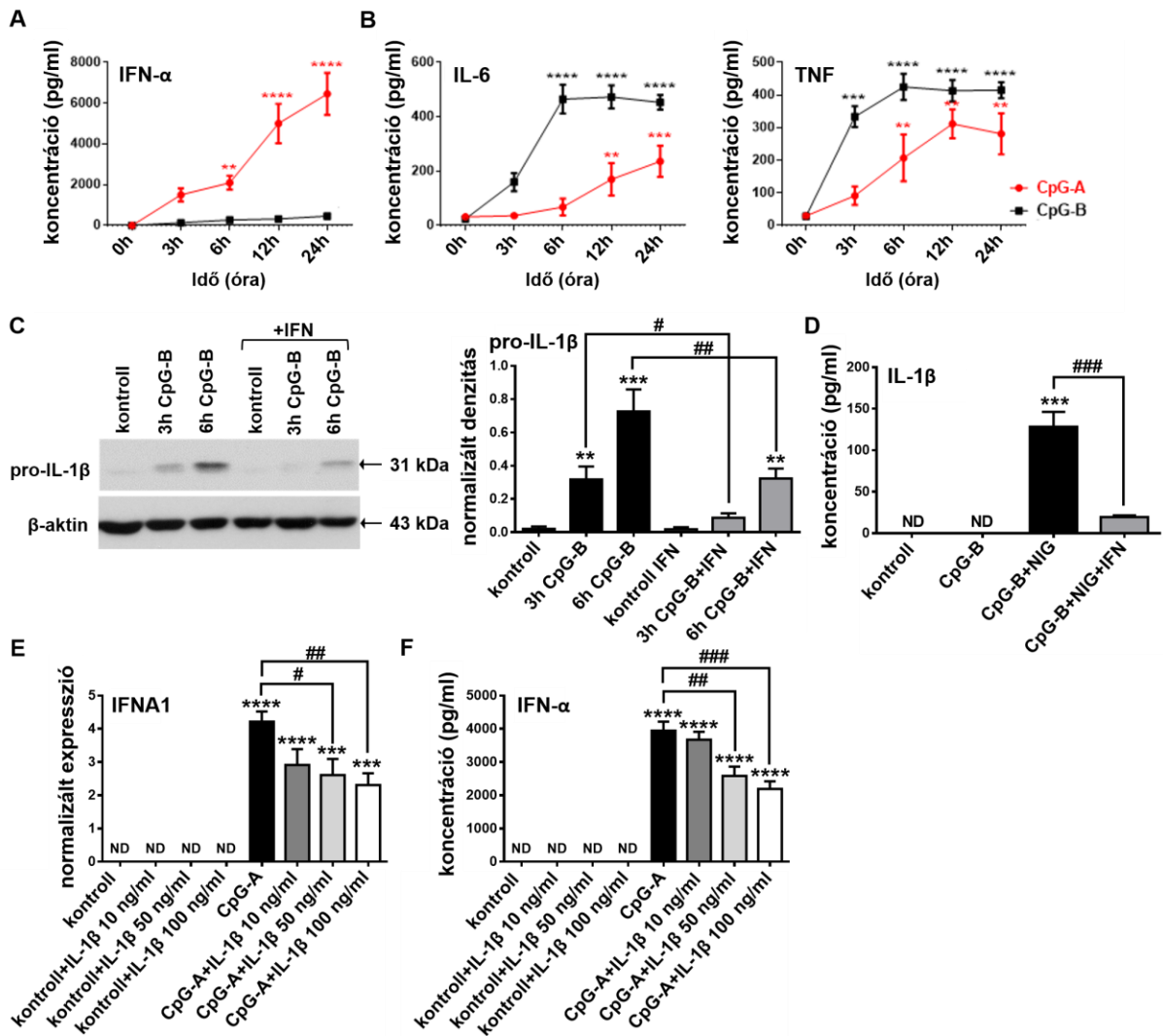
33. ábra. A különböző TLR ligandok IL-1 β szekréciónak aktiváló képessége eltérő a primer humán pDS-ekben. PBMC-t izoláltunk egészséges donorok perifériás véréből, majd áramlási citometria segítségével vizsgáltuk az IL-1 β útvonal aktivitását a pDS populáción belül. A PBMC-t 1 μ M CpG-A-val, 1 μ M CpG-B-val vagy 5 μ g/ml IMQ-val előkezeltük 2,5 órán keresztül (A, B). A TLR előkezelés után 20 μ M nigericinnel aktiváltuk 1 órán keresztül a sejteket, hogy indukáljuk az IL-1 β NLRP3-függő hasítását (B). A pro-IL-1 β (A) és a hasított IL-1 β (B) pozitív sejtek százalékos arányát a pDS populáción belül intracelluláris festéssel határoztuk meg. A bal oldali reprezentatív dot plotok az (A, B) paneleken láthatók, a százalékok a pozitív sejtek arányát jelzik. A grafikonokon 22 donor átlagát \pm SD értékét ábrázoltuk. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztet alkalmaztunk. **** $p < 0,0001$ vs. kontroll. IMQ: imiquimod, NIG: nigericin, SSC: oldalirányú fényszórás.

V.2.4 A pDS-ek NLRP3 inflammaszóma aktivitásának vizsgálata I-es típusú IFN jelenlétében

Mivel eredményeink alapján a TLR9 receptor két különböző ligandja, a CpG-A és a CpG-B eltérő mértékben váltott ki érett IL-1 β termelést a pDS-ekben, feltételeztük, hogy ez a különbség a két ligand különböző I-es típusú IFN termelést indukáló képességéből adódik [256]. Ugyanabban a koncentrációban alkalmazva a két aktivátort a CpG-A nagy mennyiségű IFN- α szekréciónak eredményezett a sejtekben, mely az inkubációs idő előrehaladtával egyre fokozódott (**34. A ábra**). Ezzel szemben a CpG-B csak nagyon kis mértékben indukálta az IFN- α termelődését a GEN2.2 sejtekben (**34. A ábra**). Ugyanakkor megfigyeltük, hogy a pro-inflammatórikus IL-6 és TNF citokinek szekréciónak mindkét TLR9 ligand indukálta, habár a CpG-B esetében nagyobb mennyiségű citokin koncentrációkat detektáltunk a sejtek felülúszójában a CpG-A kezeléshez képest (**34. B ábra**). Így elmondható, hogy a CpG-A és a

CpG-B között az egyik legnagyobb különbség a nagymértékben eltérő I-es típusú IFN indukáló kapacitásuk. Így feltételeztük, hogy a CpG-A indukált IFN-oknak szerepe lehet abban, hogy a CpG-A a CpG-B-hez képest csak gyenge IL-1 β termeléshez vezet a pDS-ekben. Más sejttípusok esetén már leírták, hogy az I-es típusú IFN útvonal aktivációja gátolhatja az NLRP3-függő IL-1 β útvonalat, mivel számos olyan szabályozó molekula expresszióját fokozza, melyek megakadályozzák az IL-1 β transzkripcióját, gátolják az NLRP3 aktivációjához szükséges másodlagos szignálokat vagy pedig közvetlenül interakcióba lépnek az NLRP3 inflammaszóma komponenseivel és így korlátozzák az inflammaszóma összeszerelődését [227,228,231,257].

Ezért a CpG-B-vel történő pDS aktivációt megismételtük I-es típusú IFN, azaz IFN- α jelenlétében is. Így a sejteket CpG-B aktiválás előtt előkezeltük IFN- α -val és azt találtuk, hogy a pro-IL-1 β termelés 3 és 6 órás CpG-B aktiválást követően is gátolható volt az IFN- α citokin jelenlétében a GEN2.2 sejtekben (**34. C ábra**). Továbbá ha a CpG-B és nigericin kezelést megelőzően IFN- α citokint adtunk a sejtekhez, a hasított IL-1 β szintje is szignifikánsan alacsonyabb volt a sejtek felülúszójában (**34. D ábra**). Így elmondható, hogy az I-es típusú IFN-ok a pDS-ekben is gátolják az NLRP3-függő IL-1 β útvonal aktivitását. Érdekes módon az IL-1 β citokin jelenlétében a CpG-A indukált I-es típusú IFN termelés is szignifikánsan csökken mind mRNS (**34. E ábra**), mind protein szinten (**34. F ábra**). Ez arra utal, hogy az I-es típusú IFN és az IL-1 β útvonalak között kölcsönös negatív interakció áll fenn.

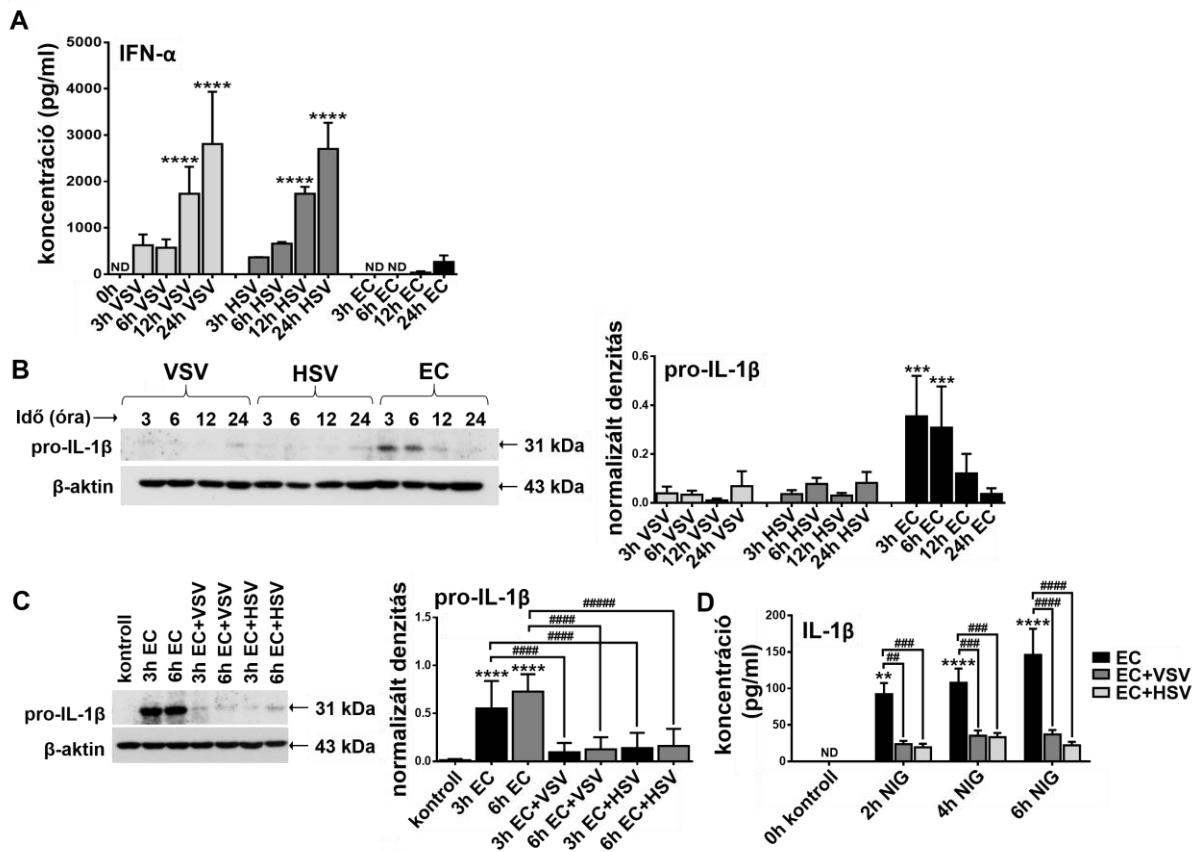


34. ábra. Az I-es típusú IFN és az IL-1 β útvonal között kölcsönös gátló hatás figyelhető meg a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-A-val vagy 1 μ M CpG-B-vel aktiváltuk időfüggő módon (A, B). Az IFN- α (A), az IL-6 és a TNF- α (B) koncentrációját ELISA módszerrel határoztuk meg a sejtek felülcszójából. Egy másik kísérlet sorozatban a sejteket 50 μ g/ml rekombináns IFN- α -val előkezeltük 3 óráig, majd 1 μ M CpG-B-vel aktiváltuk őket 3 vagy 6 órán keresztül (C). Hogy indukáljuk az IL-1 β szekrécióját, a CpG-B-vel kezelt sejteket 20 μ M nigericin jelenlétében inkubáltuk 4 órán keresztül (D). A pro-IL-1 β szintjét western blot módszerrel (C), míg az érett IL-1 β szekrécióját ELISA-val határoztuk meg (D). A (C) panel bal oldalán egy reprezentatív blot látható. Az előző kísérlethez hasonlóan a GEN2.2 sejteket koncentráció függő módon 3 óráig különböző koncentrációjú rekombináns humán IL-1 β -vel előkezeltük, majd 1 μ M CpG-A-val aktiváltuk őket 12 órán keresztül (E, F). Az *IFNA1* normalizált expresszióját Q-PCR-ral (E), míg az IFN- α koncentrációját ELISA-val (F) határoztuk meg. A grafikonok 6 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. ND: nem detektálható, NIG: nigericin.

V.2.5 A fokozott I-es típusú IFN termelődést kiváltó vírusok NLRP3 inflammaszóma aktivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata humán pDS-ekben

Ezután megvizsgáltuk, hogy a főként IRF útvonalat aktiváló és ezáltal magas I-es típusú IFN termelést eredményező vírusok a bakteriális stimulusokhoz képest milyen mértékben képesek indukálni a humán pDS-ek pro-IL-1 β termelését. Így a GEN2.2 sejteket RNS és DNS vírusokkal (VSV és HSV), illetve a korábbi eredményeink alapján jó IL-1 β indukáló képességgel rendelkező patogén baktériummal, az *E. coli*-val kezeltük (**35. ábra**). Eredményeink azt mutatták, hogy az RNS és a DNS vírus is magas IFN- α szekréciót eredményezett az *E. coli*-hoz képest (**35. A ábra**), azonban az *E. coli*-val szemben a vírusok alig váltottak ki pro-IL-1 β termelődést (**35. B ábra**).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a vírusok jelenléte befolyásolja-e a pDS-ekben az *E. coli* indukált IL-1 β termelést. Ehhez a pDS sejt vonalat 3 óráig előkezeltük VSV-vel vagy HSV-vel, mivel ennyi idő alatt már elindul a pDS-ekben az IFN termelés (**35. A ábra**), majd az előkezelést követően *E. coli*-val stimuláltuk a sejteket. Eredményeink alapján a vírusokkal történő előkezelés szignifikánsan csökkentette az *E. coli*-indukált pro-IL-1 β kifejeződést (**35. C ábra**), illetve az érett IL-1 β koncentrációja is alacsonyabb volt a nigericinnel aktivált pDS-ek felülúszójában (**35. D ábra**).

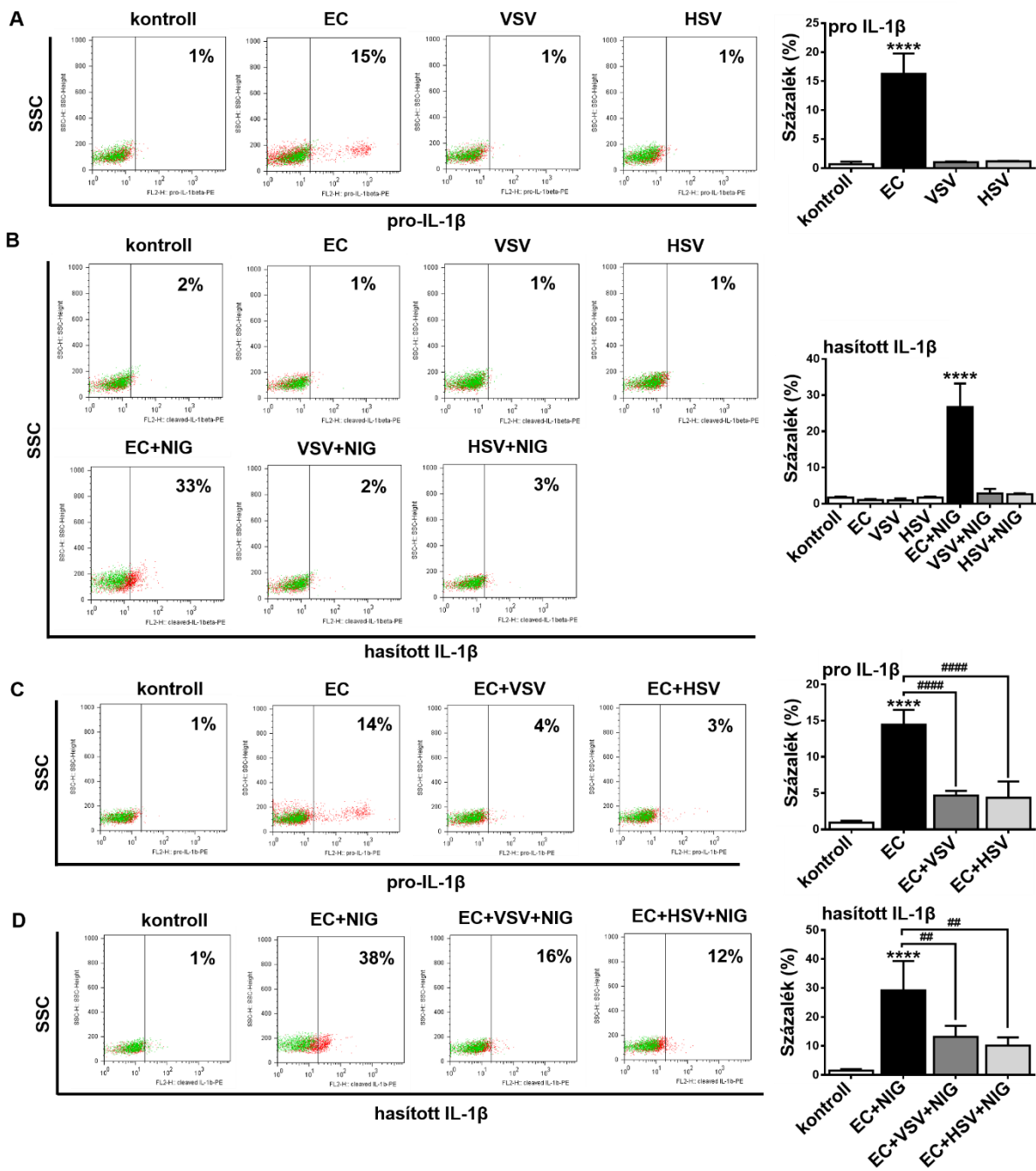


35. ábra. A vírusokkal történő előkezelés gátolja az IL-1 β termelést a humán GEN2.2 sejtvonalban. A GEN2.2 sejteket VSV-vel, HSV-vel vagy *E. coli*-val (MOI 10) aktiváltuk időfüggő módon (A, B). Az IFN- α koncentrációt ELISA-val (A), míg a pro-IL-1 β fehérje expresszióját western blot módszerrel (B) határoztuk meg. A (B) bal panelen egy reprezentatív blot látható. A GEN2.2 sejteket VSV vagy HSV jelenlétében (MOI 10) inkubáltuk 3 órán keresztül, majd a sejteket *E. coli*-val (MOI 10) aktiváltuk 3 vagy 6 órán át (C). Hogy IL-1 β szekréciót indukáljunk, az *E. coli*-val kezelt sejteket 20 μ M nigericin jelenlétében inkubáltuk időfüggő módon (C). A pro-IL-1 β -t fehérjeszinten western blottal (C), az érett IL-1 β -t a sejtek felülréséből ELISA-val (D) határoztuk meg. Egy reprezentatív blotot mutat a (C) bal panel. A grafikonokon 4 független kísérlet átlaga \pm SD értéke látható. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t alkalmaztunk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$. EC: *Escherichia coli*, HSV: herpes simplex vírus, ND: nem detektálható, NIG: nigericin, VSV: vezikuláris stomatitis vírus.

Ezután a pDS sejtvonalon kapott eredményeinket primer pDS-ekkel is validáltuk, áramlási citometria segítségével intracelluláris protein festést alkalmazva. Az egészséges donoroktól származó PBMC-eket VSV-vel, HSV-vel vagy *E. coli*-val kezeltük 2,5 órán keresztül, majd a primer pDS populáción belül vizsgáltuk a pro-IL-1 β szintjét. Azt tapasztaltuk, hogy csak az *E. coli* kezelés eredményezett szignifikáns pro-IL-1 β indukciót, a VSV és a HSV esetében nem történt változás a kezeletlen, kontroll mintákhoz képest (36. A ábra). Ha a sejteket a vírus és baktérium expozíciót követően, 1 órán keresztül nigericinnel is kezeltük, szintén csak az *E. coli*-val előkezelt sejtek esetében volt detektálható az IL-1 β hasított formája (36. B ábra). A VSV és a HSV előkezelés nem indukálta az IL-1 β szekrécióját nigericin

jelenlétében sem **(36. B ábra)**. Tehát a GEN2.2 sejtekhez hasonlóan az NLRP3-függő IL-1 β útvonal vírus expozíció hatására nem indukálható primer humán pDS-ekben.

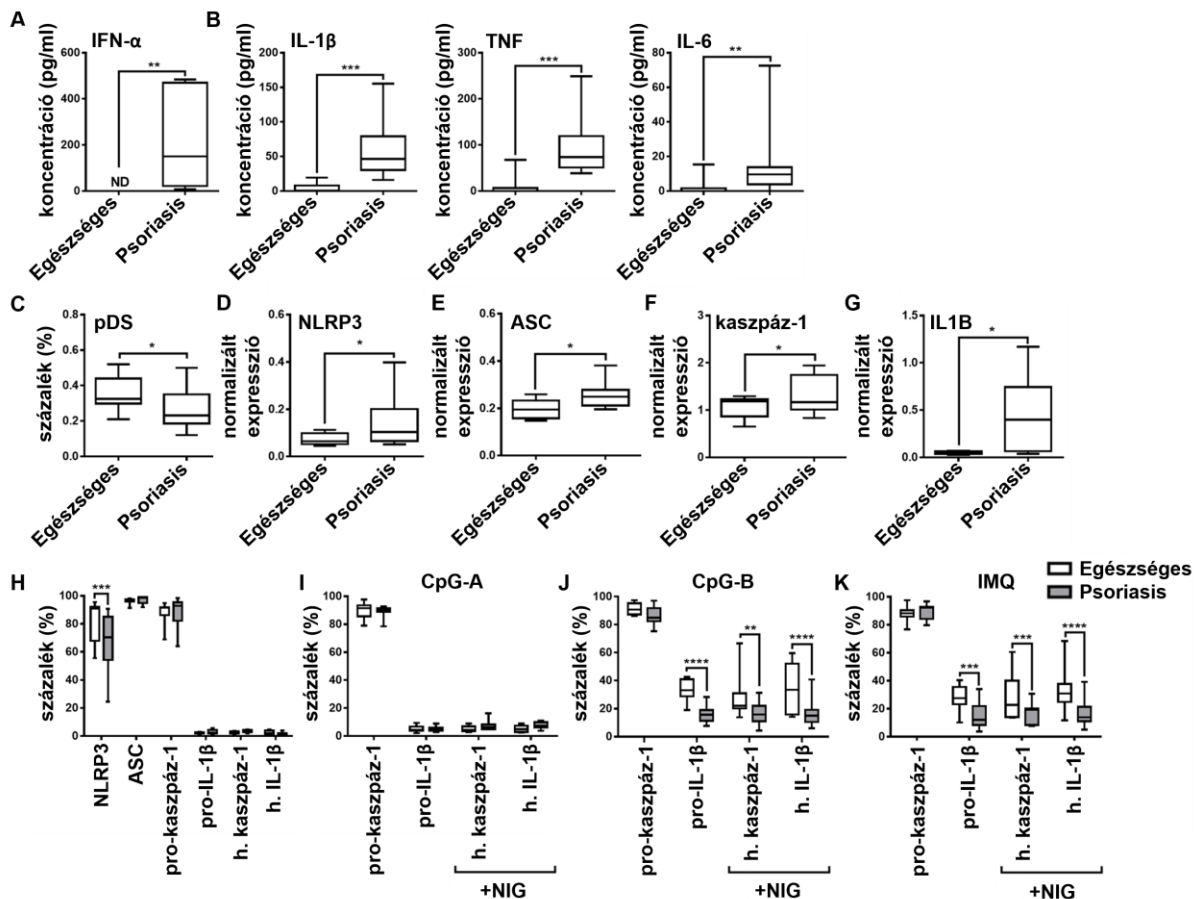
A vírusokkal történő előkezelés gátló hatása a baktérium-indukált IL-1 β termelésre nemcsak a pDS sejtvonalba, hanem a primer pDS-ekben is megfigyelhető volt. Ha a sejteket VSV vagy HSV vírussal előkezeltük, az *E. coli* indukált pro-IL-1 β expresszió szignifikánsan lecsökkent **(36. C ábra)**. Az IL-1 β hasított formája is csak azokban a sejtekben volt detektálható, ahol az *E. coli* és a nigericin stimuláció előtt a sejteket nem kezeltük vírusokkal **(36. D ábra)**. Eredményeink alapján elmondható, hogy a pDS-ek baktérium-indukált IL-1 β termelése RNS és DNS vírusok jelenlétében háttérbe szorul, mely valószínűleg a vírus-indukált I-es típusú IFN-ok NLRP3 aktivációra kifejtett gátló hatásainak tulajdonítható.



36. ábra. A VSV vagy HSV előkezelés gátolja az IL-1 β termelést a primer humán pDS-ekben. PBMC-t izoláltunk egészséges donorok perifériás véréből, majd áramlási citometria segítségével vizsgáltuk az IL-1 β indukciót a pDS populáción belül (A-D). A PBMC-t *E. coli*, VSV vagy HSV (MOI 10) jelenlétében inkubáltuk 2,5 órán keresztül (A, B). Az előkezelés után a sejteket 20 μ M nigericinnel aktiváltuk 1 órán át (B). Párhuzamos kísérletekben a sejteket 3 órán keresztül VSV-vel vagy HSV-vel (MOI 10) előkezelte, majd további 3 óráig *E. coli*-val (MOI 10) aktiváltuk őket (C, D). Hogy indukáljuk a pro-IL-1 β hasítását, további 1 órán keresztül nigericin jelenlétében inkubáltuk a sejteket (D). A pro-IL-1 β (A, C) és a hasított IL-1 β (B, D) pozitív pDS-ek százalékos arányát intracelluláris festéssel határoztuk meg. Repreratív dot plotok láthatóak az (A-D) bal paneleken, a százalékok a pozitív sejtek arányát jelzik. A jobb oldali oszlopdiagramok 4 független kísérlet átlagát \pm SD értékét ábrázolják. A statisztikai elemzéshez egyutas ANOVA-t végeztünk, melyet Bonferroni post hoc teszt követett. *** $p < 0,0001$ vs. kontroll; ## $p < 0,01$, #### $p < 0,0001$. EC: *Escherichia coli*, HSV: herpes simplex vírus, NIG: nigericin, SSC: oldalirányú fényszórás, VSV: vezikuláris stomatitis vírus.

V.2.6 A pDS-ek NLRP3 inflammaszóma aktivitásának vizsgálata magas IFN szignatúrával asszociált autoimmun betegségben

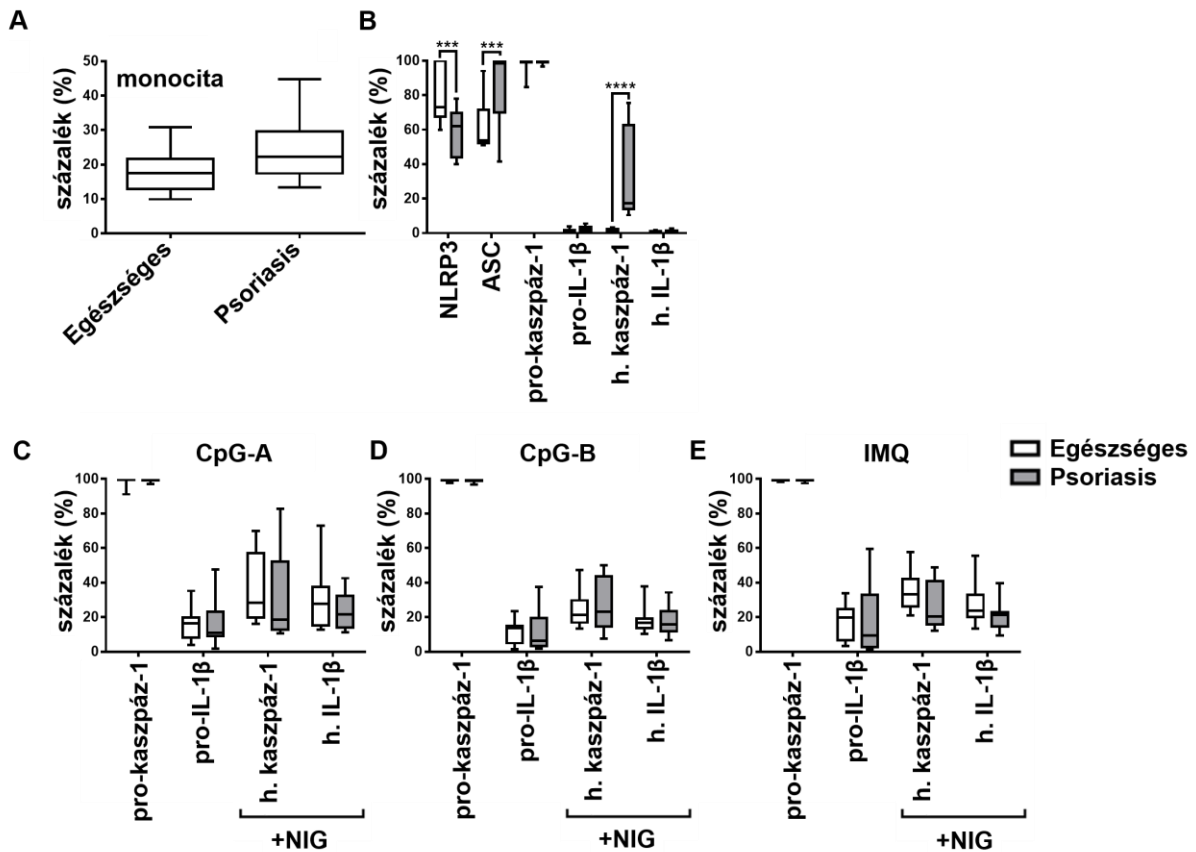
Végül fel kívántuk térképezni, hogyan változik a humán pDS-ek IL-1 β termelő képessége olyan patológiás körülmények mellett, melyek során a sejtek nagy mennyiségű I-es típusú IFN expozíciónak vannak kitéve. Így plakk típusú psoriasisban szenvedő betegek pDS-eiben is megvizsgáltuk az IL-1 β útvonal aktivitását, mivel ez az autoimmun betegség magas I-es típusú IFN szinttel asszociált, illetve a pDS-ek túlműködése és az I-es típusú IFN-ok túltermelése is szerepet játszik a betegség patogenezisében [258]. Ennek megfelelően a psoriasisos betegek szérum mintáiban szignifikánsan magasabb IFN- α szintet mértünk az egészséges donorokhoz képest (**37. A ábra**) és a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek, úgymint az IL-1 β , TNF és IL-6 koncentrációja is szignifikánsan emelkedett volt a betegek szérum mintáiban (**37. B ábra**). Megállapítottuk továbbá, hogy az egészséges donorokhoz viszonyítva a psoriasisos betegek perifériás véréből izolált PBMC rétegben a pDS populáció százalékos aránya szignifikánsan alacsonyabb volt (**37. C ábra**). Ezt feltételezhetően az okozhatja, hogy a pDS-ek a vérkeringésből kilépve a betegek gyulladt bőrlézióiba vándorolnak és ott akkumulálódva részt vesznek a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban [258]. Továbbá a betegek teljes PBMC-jét vizsgálva az *NLRP3*, az *ASC*, a *kaspáz-1* és az *IL1B* mRNS-ek fokozott expresszióját figyeltük meg az egészséges donorokhoz viszonyítva (**37. D-G ábra**). A pDS populáción belül ugyanakkor az *NLRP3* protein szintű expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges egyének pDS-eihez képest (**37. H ábra**). Az *ASC* és a *kaspáz-1* fehérjék alapszintű expressziójában viszont nem volt különbség a betegek és az egészséges egyének pDS-eiben (**37. H ábra**). Aktivációs szignál nélkül a *kaspáz-1* hasított formája, valamint az IL-1 β pro és hasított formája is csak elenyésző szinten volt jelen a psoriasisos és az egészséges donorok pDS-eiben (**37. H ábra**). Megfigyeltük továbbá, hogy korábbi kísérleteinkhez hasonlóan a CpG-A kezelés nem indukálta az inflammaszóma komponensek expresszióját sem az egészséges egyénekből, sem a psoriasisos betegekből származó pDS-ekben (**37. I ábra**). Ugyanakkor a psoriasisos betegek pDS-eiben a CpG-B és az Imiquimod kezelés nigericin jelenlétében is szignifikánsan alacsonyabb pro-IL-1 β , hasított-*kaspáz-1* és hasított IL-1 β pozitivitást eredményezett az egészséges donorok pDS-eihez képest (**37. J,K ábra**). Így valószínűsíthető, hogy a betegek pDS-eiben a nagyfokú I-es típusú IFN útvonal aktivitás gátolja az IL-1 β útvonalat.



37. ábra. A magas IFN szignatúrával és inflammatórikus citokin profillal rendelkező psoriasisos betegek PBMC-je magas, míg pDS-ei csökkent NLRP3 útvonal aktivitással jellemezhetőek. Egészséges egyénektől és psoriasisos betegektől perifériás vért vettünk, majd a PBMC réteget Ficoll Paque Plus gradiens centrifugálással elválasztottuk, a vérplazmát pedig -70°C -on tároltuk az elemzésig. Az IFN- α (A), az IL-1 β , a TNF- α és az IL-6 (B) plazma koncentrációját ELISA-val vizsgáltuk. A primer pDS-ek százalékos arányát áramlási citometriával határoztuk meg (C). Az *NLRP3* (D), az *ASC* (E), a *kaspáz-1* (F) és az *IL1B* (G) alapszintű expresszióját Q-PCR segítségével vizsgáltuk a PBMC rétegből. Egyes kísérletekben a PBMC-t kezeletlenül hagytuk (H) vagy 1 μM CpG-A-val, 1 μM CpG-B-vel vagy 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Imiquimoddal (IMQ) aktiváltuk 2,5 órán keresztül (I-K), majd 20 μM nigericinnel stimuláltuk 1 órán keresztül a sejteket, hogy indukáljuk az IL-1 β és a kaspáz-1 NLRP3-függő hasítását (I-K). Az NLRP3 inflammaszóma útvonal komponenseinek alapszintű (H) és az aktiváció indukált (I-K) expresszióját intracelluláris áramlási citometriával vizsgáltuk a kikapuzott pDS populációban. Az adatok 14-14 független donor átlagát \pm SD értékét mutatják. A statisztikai elemzéshez párosítatlan Student t-tesztet (A-G) és kétirányú ANOVA-t használtunk, melyet Bonferroni post hoc teszt (H-K) követett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. egészséges kontroll. H. IL-1 β : hasított IL-1 β , h. kaspáz-1: hasított kaspáz-1, IMQ: imiquimod, NIG: nigericin.

Az NLRP3 inflammaszóma komponensek expresszióját a pDS-ek mellett a CD14⁺ monocita populációban is vizsgáltuk, mivel a monociták által túltermelt gyulladásozó citokineknek is fontos szerepe van a psoriasis patológiájában [259–261]. Mivel a monociták I-es típusú IFN termelő képessége jóval korlátozottabb, mint a pDS-eké [262–265], tesztelni kívántuk, hogy e sejtpopuláció esetén hogyan változik az NLRP3 aktivitás psoriasisos betegekben az egészséges egyénekhez képest. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a

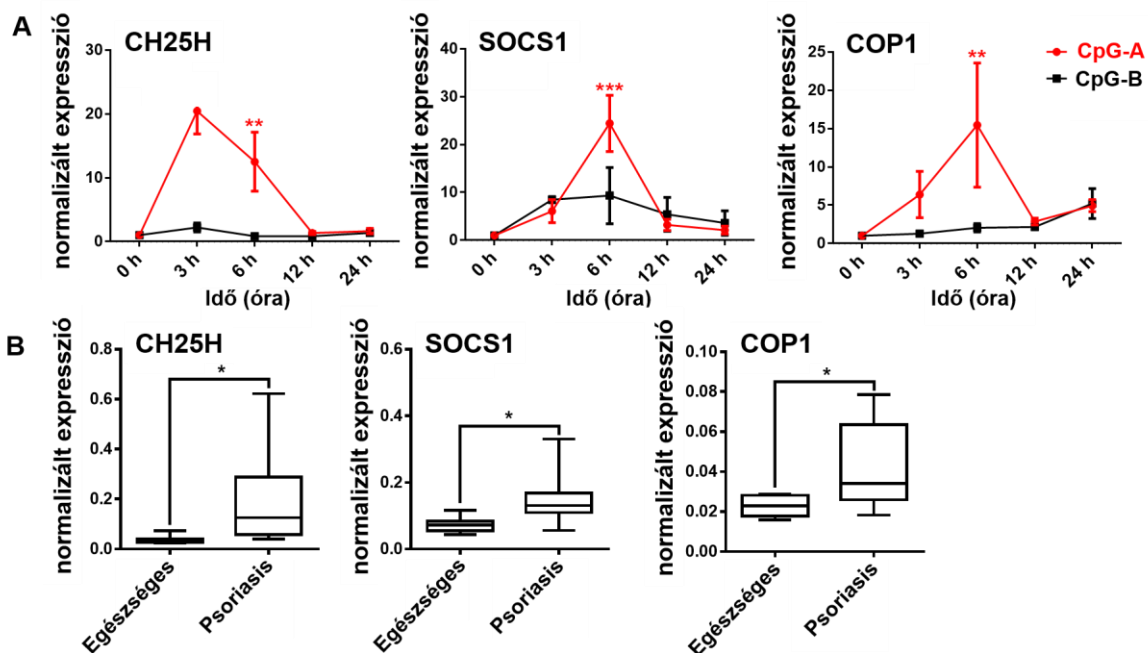
psoriasisos betegek PBMC-jében nem szignifikánsan, de emelkedett a monocita populáció százalékos aránya az egészséges donorokhoz képest (**38. A ábra**). Továbbá a pDS populációhoz hasonlóan szignifikánsan csökkent NLRP3 protein szint mérhető a betegek monocitáiban (**38. B ábra**). Az ASC expresszió a monocitákban donorfüggő módon jóval szélesebb skálán mozog az egészséges és a psoriasisos egyéneknél a pDS-ekhez viszonyítva, és az ASC szintje a psoriasisos betegek monocitáiban szignifikánsan emelkedett is (**38. B ábra**). A legnagyobb eltérés a két sejt populáció között, hogy a betegek monocitáiban aktivációs szignál nélkül is magas a hasított kaszpáz-1 szintje, ugyanakkor az IL-1 β citokin pro és hasított formája is csak marginális szinten detektálható (**38. B ábra**). Hasonló aktivációs szignálok (CpG-A, CpG-B, Imiquimod és nigericin) mellett a betegek monocitái esetében nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a hasított kaszpáz-1, a pro-IL-1 β és a hasított IL-1 β fehérjék expressziós értékeiben (**38. C-E ábra**), szemben a pDS populációval (**37. I-K ábra**). Érdekes módon a monocitákban a CpG-A vagy a CpG-A és nigericin együttes kezelése is kiváltotta ezeknek a fehérjéknek a fokozott kifejeződését (**38. C ábra**), mivel valószínűleg a CpG-A hatására egyáltalán nem vagy csak nagyon kis mértékben indukálódik az I-es típusú IFN-ok termelődése ebben a sejttípusban. Tehát szemben a pDS-ekkel, a betegek monocitáit magasabb NLRP3 aktivitás jellemezte.



38. ábra. A psoriasisos betegek monocitái nem mutatnak csökkent NLRP3 útvonal aktivitást a pDS-eknél használt aktivációs stimulusok mellett. Egészséges egyénektől és psoriasisos betegektől perifériás vért vettünk, majd a PBMC réteget Ficoll Paque Plus gradiens centrifugálással elválasztottuk, a vérplazmát pedig -70°C -on tároltuk az elemzésig. A psoriasisos és az egészséges egyénekben a monociták százalékos arányát is vizsgáltuk áramlási citometriával a PBMC-ben (A). A monocitákban az NLRP3 útvonal komponenseinek alapszintű (B) és aktiváció indukált (C-E) expresszióját intracelluláris festéssel áramlási citometriával határoztuk meg. Az adatok 14-14 független donor átlagát \pm SD értékét mutatják. A statisztikai elemzéshez párosítatlan Student t-tesztet (A) és kétirányú ANOVA-t használtunk, melyet Bonferroni post hoc teszt (B-E) követett. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ vs. egészséges kontroll. H. IL-1 β : hasított IL-1 β , h. kaspáz-1: hasított kaspáz-1, IMQ: imiquimod, NIG: nigericin.

Hogy kiderítsük a pDS-ek esetében milyen mechanizmus állhat az I-es típusú IFN-ok inflammaszóma gátló aktivitásának hátterében, megvizsgáltuk az IFN- α indukált NLRP3-függő IL-1 β szekréciót gátló molekulák expresszióját a humán pDS-ekben. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az I-es típusú IFN-ok receptoraikhoz kapcsolódva aktiválják a STAT1 transzkripciós faktort, mely számos olyan molekula expresszióját és aktivitását fokozza, melyek több szinten is képesek gátolni az NLRP3 útvonalat [227,266,267]. Ilyen negatív szabályozók többek között a CH25H, az IL-10, az IL-1Ra, az iNOS, a SOCS1, a POP és a COP fehérjék [227,266,267]. Kísérleteink alapján a humán pDS-ekben a *CH25H*, a *SOCS1* és a *COP1* expressziója nagymértékben indukálható, ha a sejteket a fokozott I-es típusú IFN termelést kiváltó aktivációs szignállal, CpG-A-val kezeljük. Ezzel szemben a CpG-B, mely inkább NF- κ B aktivátor, nem indukálta ezeknek az NLRP3 aktivációt gátló fehérjéknek az mRNS szintű expresszióját (**39. A ábra**). Ezután megvizsgáltuk az NLRP3-at gátló molekulák expresszióját a psoriasisos betegekben is és azt találtuk, hogy a betegek PBMC-jében szignifikánsan magasabb a *CH25H*, a *SOCS1* és a *COP1* mRNS szintű expressziója az egészséges donorokhoz képest (**39. B ábra**). Így valószínűsíthető, hogy a magas I-es típusú IFN szint hatására indukálódó CH25H megakadályozhatja az IL-1 β transzkripcióját, a SOCS1 gátolhatja az NLRP3 aktiválódásához szükséges másodlagos szignálokat, a COP1 pedig korlátozhatja a kaszpáz-1 aktiválódását a psoriasisos betegekben [228,231,268].

Összefoglalva, a pDS-ek alacsonyabb NLRP3-függő IL-1 β termelő képessége az aktiváció indukált magas I-es típusú IFN termelő képességüknek köszönhető, mely gátlólag hat az NLRP3 inflammaszóma aktiválódására.



39. ábra. Erős I-es típusú IFN útvonal aktivitás mellett emelkedett az NLRP3 útvonalat gátló gének expressziója a pDS-ekben, illetve a psoriasisos betegek PBMC-jében. A GEN2.2 sejteket 1 μ M CpG-A-val vagy 1 μ M CpG-B-vel kezeltük időfüggő módon (A). A *CH25H*, a *SOCS1* és a *COP1* expresszióját Q-PCR segítségével vizsgáltuk (A). Egészséges önkéntesek és psoriasisos betegek perifériás véréből PBMC-t izoláltunk és a *CH25H*, a *SOCS1* és a *COP1* expresszióját Q-PCR segítségével határoztuk meg (B). Az oszlopdiagramok 4-14 független kísérlet átlagát \pm SD értékét mutatják. Az adatokat egyutas ANOVA-val, majd Bonferroni post hoc teszttel (A) vagy párosítatlan Student t-teszttel (B) elemeztük. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontroll vagy egészséges kontroll.

VI. Megbeszélés

Fertőzések során az immunrendszer alapvető feladata, hogy gyors és erőteljes immunválaszt váltson ki, mely egyrészt eliminálja a betolakodó kórokozókat, másrészt elősegíti a gyulladás lecsengését, a szöveti homeosztázis helyreállítását és elindítja a regenerációs folyamatokat.

Az immunválasz során elsőként a gyulladást kiváltó ágensek érzékelése a cél, melyet a természetes immunrendszer sejtjeiben, így a DS-ekben is kifejeződő különböző PRR-ek tesznek lehetővé, melyek a felismerést követően elindítják a veleszületett immunválaszt közvetítő jelátviteli útvonalakat [269]. Az általunk vizsgált PRR-ek közül az RLR-ek olyan citoszólikus szenzorok, melyek a virális nukleinsavak felismerésére specializálódtak és a mitokondriális MAVS adaptor fehérjén keresztül olyan effektor molekulák termelődését indítják el, mint például az I-es típusú IFN-ok vagy egyéb pro-inflammatórikus citokinek, melyek fontos szerepet játszanak a lokális antivirális válaszban [270,271]. Habár az RLR jelátvitel aktiválása esszenciális a vírus terjedésének megfékezéséhez, a túlzott immunválasz, illetve a nemkívánatos szövetkárosodások megelőzése érdekében ez a receptor útvonal is szigorú szabályozás alatt áll [272]. A veleszületett immunitás RLR-közvetített jelátvitelét számos molekula szabályozza, melyek fiziológias körülmények között nyugalmi állapotban, illetve vírusfertőzések esetén is finomhangolják az immunválaszokat [273]. E szabályozás receptor-receptor kölcsönhatáson is alapulhat, mivel egyéb citoszólikus receptorokról, így az NLR család több tagjáról is leírták már, hogy az immunaktiváció ellenőrzőpontjaiként szolgálhatnak. Így például az NLR-ek közül az NLRC5 és az NLRX1 is képes közvetlen kölcsönhatásba lépni a RIG-I közvetített antivirális jelátviteli útvonal molekuláival [149,274].

Az NLRX1 kezdetben az antivirális válaszok negatív szabályozójaként vált ismertté [155]. Moore és munkatársai leírták, hogy az NLRX1 a mitokondrium külső membránján lokalizálódva kölcsönhatásba lép a MAVS-szal és így az RLR jelátviteli útvonalakat negatívan szabályozza humán epiteliális HEK293T sejtekben [155]. Azóta számos tanulmány vizsgálta már az NLRX1 szerepét az antivirális jelátvitel során mind *in vitro*, mind *in vivo*, de ellentmondásos eredmények születtek és az NLRX1 szerepe máig kérdéses. Egyes tanulmányok kimutatták, hogy az NLRX1 hiányos egerekben fokozottan expresszálódnak az IFN- β és az IL-6 citokinek a RIG-I-et aktiváló vírusok hatására [156]. Ezzel szemben három másik munkacsoport arról számolt be, hogy az NLRX1 hiánya nem befolyásolja az RLR szignalizációt [157,158,159].

Eddig csak egy tanulmány vizsgálta az NLRX1 funkcióját humán DS-ekben [275]. Guo és munkatársai leírták, hogy NLRX1 hiányában a humán moDS-ek fogékonyabbá váltak a HIV-1 fertőzésre [275]. A fentebb említett tanulmányok ellentmondásai azonban arra utalnak, hogy az NLRX1 szerepe nagyban sejtspecifikus lehet, ezért meg kívántuk vizsgálni az NLRX1 RLR útvonalra gyakorolt hatását a humán pDS-ekben is, mely sejtek az antivirális válasz „karmesterei”. A korábbi irodalmi adatok, illetve saját eredményeink is azt támasztják alá, hogy a pDS-ek funkcionális sajátosságai jelentősen eltérnek mieloid „társaikétól”, így vizsgálataink során kontrollként moDS-eket is használtunk, mely DS altípusok a mieloid DS-ek modelljeként szolgálnak. Eredményeink alapján az NLRX1 konstitutívan expresszálódik a humán pDS-ekben a moDS-ekhez hasonlóan, és befolyásolja a RIG-I-közvetített I-es típusú IFN termelést ezekben a sejttypusokban, mivel NLRX1 hiányában fokozott IFN választ tudtunk detektálni. Továbbá a pDS-ekben az NLRX1 csendesítése nem volt hatással az RLR-stimuláció indukált pro-inflammatorikus citokin (TNF, IL-6) és kemokin (IL-8) szekrécióra, míg a moDS-ekben fokozta azt. Ezt támasztja alá az is, hogy az I κ B α csak az NLRX1 csendesített moDS-ekben degradálódott a RIG-I ligandum 5'ppp-dsRNS vagy a RIG-I/MDA5 agonista polyI:C stimulációt követően, a pDS-ekben pedig nem volt megfigyelhető NF- κ B útvonal aktivitás. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az NLRX1 túlnyomórészt az RLR jelátviteli útvonal negatív szabályozójaként működik a humán DS-ekben, azonban hatása sejtspecifikus, melyet nagyban befolyásol az adott sejttypus funkcionális preferenciája.

Munkánk során az NLRX1 mellett vizsgáltuk az NLRC5 szerepét is az RLR útvonal szabályozásában. Az NLRC5 elsősorban az MHC I. molekulák transzaktivátoraként ismert, ugyanis aktiválódását követően a sejtmagba kerül és az MHC I. gének promótereirekhez kötődve szabályozza expressziójukat [165, p5]. Az NLRC5-öt széles körben kifejezik a hematopoetikus sejtek és expresszióját nagymértékben indukálják a fertőzések hatására termelődő I-es és II-es típusú IFN-ok [160]. Ezen irodalmi adatokhoz hasonlóan, saját eredményeink is azt mutatták, hogy az NLRC5 expresszió fokozatosan nő a differenciálódó moDS-ekben és TLR9 aktiváció hatására a pDS-ekben is. Az utóbbi évek vizsgálatai alapján az NLRC5 részt vesz az antivirális immunválasz modulációjában, bár szabályozó szerepét illetően az eredmények eléggé ambivalensek, hasonlóan az NLRX1-hez. Humán fibroblasztokban, légúti epitél sejtekben és THP-1 sejtekben leírták, hogy a vírusok vagy a szintetikus RLR ligandok indukálta antivirális választ pozitívan szabályozza az NLRC5 és szükséges az I-es típusú IFN-ok termeléséhez [164,217,218]. Ezzel ellentétben mások kimutatták, hogy az NLRC5 negatívan szabályozza az NF- κ B és az I-es típusú IFN útvonalakat 293T, THP-1 és RAW264.7 sejtekben [153], illetve egér embrionális fibroblasztokban, peritoneális és csontvelő eredetű makrofágokban [154].

Egyes vizsgálatok szerint pedig az NLRC5-nek nincs szerepe az antivirális immunválaszban az egér csontvelő eredetű makrofágokban és DS-ekben [154,219]. Az NLRC5 szerepét pDS-ekben eddig még nem vizsgálták, ugyanakkor saját eredményeink alapján a pDS-ek RLR-indukált I-es típusú IFN termelését negatívan szabályozhatja ezen NLR altípus. A kontrollként alkalmazott moDS-ek IFN produkcióját viszont nem befolyásolta az NLRC5 csendesítése. Továbbá az NLRC5 hiánya nem volt hatással az RLR-közvetített pro-inflammatórikus citokin válaszra sem a pDS-ekben, sem a moDS-ekben. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az NLRC5 negatívan szabályozza az RLR-közvetített I-es típusú IFN válaszokat a humán pDS-ekben, de nincs hatással a pro-inflammatórikus citokin termelődést indukáló jelátvitelükre. Továbbá úgy tűnik, hogy nem játszik szerepet a moDS-ek RIG-I jelátviteli útvonalának szabályozásában sem.

Munkánk során tehát kimutattuk, hogy a humán pDS-ekben is működnek az RLR-ek és a regulatórikus NLR-ek közötti interakciók, főként az I-es típusú IFN termelés szabályozásának tekintetében. A regulatórikus NLR-ek szabályozó hatása valószínűleg azokban a sejtfunkciókban érvényesül leginkább, melyeket az adott sejt előtérbe helyez. A pDS-ek minden más sejttypusnál nagyobb mennyiségű I-es típusú IFN-t termelnek, így leginkább antivirális aktivitásukról ismertek [276]. Ezzel szemben az NF- κ B-közvetített pro-inflammatórikus citokin szekréciójuk elhanyagolható a mieloid DS-ekhez képest. Így az NLRX1 főként a jelentős pro-inflammatórikus citokin termelésre képes moDS-ek NF- κ B-függő antimikrobiális válaszáinak fontos szabályozója, míg az I-es típusú IFN-ok termelésére specializálódott pDS-ekben elsősorban az antivirális válaszok szabályozójaként működik. Tehát a regulatórikus NLR-ek fő funkciója feltételezhetően a protektív, negatív visszacsatolási mechanizmusok sejttypus-specifikus biztosítása, melyek főként azokat a sejtfunkciókat szabályozzák, melyek túlzott aktivitása drasztikusan felboríthatja az immunhomeosztázist.

Munkánk során nemcsak a regulatórikus, hanem az inflammaszóma formáló NLR-eket is tanulmányoztuk, melyek az IL-1 β -közvetített immunválaszokért felelősek. A pDS-ek esetén eddig főként az endoszómális TLR-ek tanulmányozása került ez idáig előtérbe, melyek aktivációja révén valósul meg a pDS-ek I-es típusú IFN válaszáinak nagymértékű, első hulláma. Ezért nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arról, hogy a citoszólikus, inflammaszóma formáló NLRP3 receptor funkciója és az aktivitásához köthető gyulladáscsökkentő citokin, az IL-1 β effektor funkciói milyen szerepet játszhatnak a pDS-mediált immunválaszokban.

2009-ben Crozat és munkatársai már leírták, hogy az egér és a humán pDS-ek alacsony antibakteriális aktivitással bírnak, ugyanis az antibakteriális immunitásban résztvevő NLR-ek, köztük az NLRP3 is alacsony mRNS expressziót mutatott ezekben a sejtekben, szemben a cDS2

altípussal [186]. A humán DS altípusok közül a kaszpáz-1 is csak a cDS2-kben mutatott magas mRNS expressziót, míg a humán pDS-ekben és a cDS1-ekben csak marginális szinten fejeződött ki [186], mely megfigyelést Worah és munkatársai protein szinten is alátámasztották [187]. Egy másik, friss tanulmány szintén a cDS2-ket jelölte meg potens IL-1 β termelő sejteknek, szemben a pDS-ekkel és a cDS1-ekkel [277]. Így ezek a tanulmányok a cDS2 altípushoz viszonyított igen alacsony pDS kaszpáz-1 expreszióra alapozva nem feltételezték, hogy a pDS-ek rendelkeznek inflammaszóma aktivitással. Azonban fontos kiemelni, hogy ezekben a tanulmányokban a pDS-ek western blottal detektált pro-kaspáz-1 protein szintű kifejeződése [187], illetve a sejtek felülcsúszójából mért szekretált IL-1 β [277] detektálása a cDS2 altípussal összehasonlításban történt, így a cDS2-k kiemelkedően magas expressziós értékei mellett a pDS-ek értékei elmaszkírozódhattak.

Ugyanakkor a pDS-ek funkciói sokrétűbbek, mint azt korábban gondolták, és nemcsak „vírus-specifikus” immunsejtek, hanem a baktériumok és a gombák elleni immunválaszokban is fontos szerepet játszhatnak [76,114–116], amikben az NLRP3-függő IL-1 β útvonal is jelentős aktivitást mutat.

Így munkacsoportunk először megvizsgálta, hogy a humán pDS-ekben detektálható-e NLRP3 aktivitás. Protein szinten western blot módszer segítségével ki tudtuk mutatni az NLRP3 receptort, az ASC adaptor proteint és a pro-kaspáz-1-et is az aktiválatlan és az aktivált sejtekben egyaránt. Az NLRP3 aktivitásához köthető gyulladáshoz citokinek közül viszont csak az IL-1 β pro-formája volt detektálható protein szinten és csakis kizárólag aktivációt követően. Az IL-1 α és IL-18 citokinek protein szintű termelődését nem tudtuk kimutatni egyik kísérletünk során sem. Ezek alapján elmondható, hogy a humán pDS-ekben főként az IL-1 β -nak lehet szerepe az NLRP3 által közvetített antimikrobiális immunválaszokban.

Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a különböző aktivációs szignálok eltérő módon indukálják az IL-1 β pro-formájának a kifejeződését pDS-ekben. Így például az endoszómális TLR9 receptor két eltérő szerkezetű ligandjai közül csak az egyik, a CpG-B bizonyult potens pro-IL-1 β induktornak, szemben a CpG-A-val. E megfigyelésünk összhangban van az irodalmi adatokkal, miszerint a különböző TLR agonisták eltérő IL-1 β indukciós profillal rendelkezhetnek [278]. Továbbá kimutattuk, hogy a pDS-ekben a pro-IL-1 β korai indukcióval jellemezhető az aktivációt követően, hasonlóan a monocitákhoz és a makrofágokhoz [279–282]. Viszont a különböző TLR aktivációs szignálok nemcsak indukciót kiváltó képességükben különböztek, hanem más-más pro-IL-1 β termelődési kinetikát is eredményeztek. Míg a TLR9 agonista, CpG-B 3-6 órás pro-IL-1 β termelődési csúcsot követően nem indukálta a citokin további termelődését a későbbi időpontokban, addig a TLR7 agonista, Imiquimod elnyújtott

pro-IL-1 β termelődési kinetikát mutatott. Az Imiquimodról korábban leírták, hogy összetett aktivációs hatást közvetíthet a sejtekben és TLR7 független hatásai is vannak [283–285]. A kinon oxidoreduktáz 2-n és a mitokondriális komplex I-en keresztül ROS-t indukál, mely K⁺ efflux független NLRP3 aktivációt eredményezhet a NEK7 adaptor proteinen keresztül [278]. A ROS-ok mellett, hogy másodlagos szignálként indukálják az NLRP3 összeszerelődését, priming szignálként is funkcionálnak és az NF- κ B jelátviteli útvonal aktivitás növelésével fokozzák az NLRP3 és a pro-IL-1 β expressziót is [286,287]. Így valószínűsíthető, hogy az Imiquimod ROS indukáló hatása szerepet játszhat az elnyújtott pro-IL-1 β termelődési kinetikában a pDS-ekben is. Megjegyzendő, hogy a monocitákból különféle citokinek hatására differenciálódott makrofág altípusok is eltérő IL-1 β termelődési kinetikát mutatnak [279], így feltételezhető, hogy az aktivációs szignálok minősége nagy hatással van a sejtek IL-1 β kinetikájának profiljára.

Míg az aktiváció indukált pro-IL-1 β termelődés főként korai időpontokra volt tehető a pDS-ekben, addig a pro-IL-1 β termelődést indukáló TLR aktivátorok, így a CpG-B és az Imiquimod is a késői inkubációs időpontokban, főként 24 óránál fokozta nagymértékben a pro-kaspáz-1 protein szintű kifejeződését, amikor már az Imiquimod aktiváció esetében is lecsengett a pro-IL-1 β indukció a sejtekben. Hasonló növekedést figyeltek meg a CD1c⁺ DS-ek esetében is a pro-kaspáz-1 szintekben egy éjszakai R848 kezelés után [187]. Ezzel szemben a monociták és a makrofágok esetében konstitutívan magas pro-kaspáz-1 szintek detektálhatóak aktivációs szignáltól függetlenül [279,288]. Ezek alapján feltételezhető, hogy pDS-ekben egy 24 órás TLR aktivációt követő TLR restimuláció magasabb NLRP3 inflammaszóma aktivitással járhat a szignifikánsan magasabb kaspáz-1 szint miatt. Ugyanakkor ezt a hipotézist kísérleteink során a humán pDS-ek *in vitro* körülmények közötti nagyon rövid élettartama miatt nem teszteltük.

Általánosságban a klasszikus, kanonikus NLRP3 aktiválódáshoz két aktivációs szignál szükséges [251]. A priming szignál az NF- κ B útvonalon keresztül fokozza az NLRP3 és a pro-IL-1 β expressziót [192], valamint az NLRP3 poszttranszlációs módosításai révén [289,290] előkészíti az inflammaszóma összeszerelődést, melyet majd ténylegesen egy másodlagos szignál indukál, mely lehet patogén, saját, vagy idegen eredetű molekula is [195]. Ugyanakkor egyes sejtípusokban, például a humán monocitákban önmagában a priming szignál is eredményezhet NLRP3-függő érett IL-1 β termelődést [291,292]. Szintén monocitákban írták le, hogy a klasszikus NLRP3 aktiváció priming hiányában is megvalósulhat a megfelelő másodlagos szignálok hatására [185]. A nem kanonikus inflammaszóma aktiváció esetében pedig kaspáz-1 független úton kaspáz-4/5 (egérben kaspáz-11) aktiváció révén történik meg

a piroptózis és az IL-1 α felszabadulás [266]. Eredményeink azt mutatták, hogy a humán pDS-ekben önmagukban a szintetikus TLR ligandokkal történő kezelés csak a priming lépésnek felel meg és nem indukál tényleges NLRP3 aktivációt és érett IL-1 β felszabadulást. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy főként a Gram negatív baktériumok endotoxinja, az LPS biztosít TLR4 aktiváción keresztül elég erős szignált a monocitákban ahhoz, hogy másodlagos aktiváció nélkül is aktiválódjon az inflammaszóma [291]. A nem-kanonikus inflammaszóma aktivációt is a citoszólikus LPS válthatja ki, mely kaszpáz-4/5/11-hez kötődve indukálja a sejtekben a piroptózist [266]. Eredményeink alapján a humán pDS-ekben a patogén Gram negatív *E. coli* baktérium bizonyult a CpG-B-hez hasonlóan erős priming szignálnak. Ugyanakkor hasonlóan a szintetikus TLR ligandokkal történő kezelésekhöz, önmagában az *E. coli* sem indukált érett IL-1 β felszabadulást, mely valószínűleg annak is köszönhető, hogy a humán pDS-ek szemben az egér pDS-ekkel nem expresszálnak TLR4-et [74,293].

Így megvizsgáltuk, hogy a priming mellett milyen másodlagos szignálok indukálhatják az NLRP3 összeszerelődését a humán GEN2.2 pDS sejtvonalban. Az általunk vizsgált másodlagos szignálok közül csak a kálium ionofórként működő bakteriális toxin, a nigericin [252] indukált detektálható, érett IL-1 β felszabadulást a sejtekben, mely már a primingot követő egy órás nigericin kezelés után is kimutatható volt a sejtek felülúszójában. Ez arra utalhat, hogy pDS-ekben a kanonikus NLRP3 inflammaszóma aktiváció K⁺ effluxot igényel. Érdekes módon eredményeink alapján a makrofágokkal szemben a pDS-ek nem expresszálják az ATP felismeréséhez szükséges P2X7 receptort. Így valószínűleg e rendkívül erős endogén veszély szignál a pDS-ek esetében nem működik NLRP3 aktivátorként, szemben a monocitákkal, makrofágokkal vagy moDS-ekkel, melyek magas P2X7 expresszióval jellemezhetőek [279,294,295].

Tehát elmondható, hogy pDS-ek esetében az általunk vizsgált aktivátorok közül a CpG-B és az Imiquimod bizonyult a legjobb priming szignálnak a pro-IL-1 β indukcióhoz, valamint nigericinnel együtt az érett IL-1 β kialakulásához, szemben a CpG-A-val. Ugyanakkor aktivációs szignál hiányában, a TLR primingot vagy a másodlagos szignált önmagában alkalmazva nem tudtunk detektálni bioaktív IL-1 β -t a primer pDS-ek esetében. Az irodalomban három korábbi cikket találtunk, ahol primer pDS-ek esetében IL-1 β termelést mutattak ki és mindhárom cikkben a mi eredményeinkkel ellentétben másodlagos szignál jelenléte nélkül detektáltak IL-1 β -t. Az egyikben 24 órás Imiquimod (R837) kezelést követően egyéb másodlagos aktivációs szignál nélkül mutattak ki a primer pDS-ek felülúszójában nagyon kis mennyiségű szekretált IL-1 β -t (körülbelül 20 pg/ml), melynek koncentrációja közel van a kimutatásra használt kit detekciós határához [296]. A másik cikkben pedig epitél sejtekkel

történő ko-kultiváció után detektáltak IL-1 β -t a ko-kultúra felülúszójából, melyet pDS aktivációhoz kötöttek és nem zárták ki a ko-kultúrában lévő epitél sejtek esetleges IL-1 β citokin termelését [297]. Az utóbbi cikkben ráadásul a kezeletlen, nem ko-kultivált pDS felülúszók esetében is igen magas szekretált IL-1 β koncentrációt (100-200 pg/ml) mértek, mely arra engedne következtetni, hogy a pDS-ekben aktiváció nélkül is aktív lehet az IL-1 β szekréción utvonal [297], ami nehezen elképzelhető aktiváció-indukált pro-IL-1 β hiányában. Megjegyzendő, hogy mindkét cikk esetében mágneses sejtseparációval történt a primer pDS-ek izolálása [296, 297], mely nem megfelelő laboratóriumi körülmények mellett alacsonyabb tisztaságú pDS populációt eredményez, amint ezt a szerzők az utóbbi publikáció esetében le is írták (>93% pDS tisztaság >98% tisztaság helyett) [297]. Ezzel szemben munkacsoportunk izolálás helyett a PBMC rétegben azonosította a humán pDS populációt és intracelluláris protein festést alkalmazva vizsgálta az NLRP3 utvonal komponensek aktivitását. Korábban munkacsoportunk már leírta, hogy a perifériás vérben a pDS populáció a BDCA4 sejtfelszíni marker és a fényszórási paraméterek együttes kombinációjával jól elkülöníthető egyéb sejtfelszíni markerek használata nélkül is [298]. Egy másik tanulmányban hozzánk hasonlóan intracelluláris jelölést alkalmaztak PBMC-t használva és 4 órás CL-087 (TLR7 ligand) kezelést követően már detektáltak IL-1 β pozitivitást a pDS populáción belül másodlagos aktiváció nélkül [262]. Viszont kiemelendő, hogy az ármalási citometriához használt anti-IL-1 β antitestjük az érett forma mellett pro-formát is detektálhat a gyártó leírása szerint, így valószínűsíthető, hogy a pro-forma adta a pozitivitást és nem a hasított forma [262]. Ezzel szemben kísérleteink során mi külön specifikus antitesteket használtunk a pro-, illetve a hasított forma kimutatására. Továbbá a pDS azonosítására használt markereikkel, a CD123-mal és a CD303-mal (BDCA2) nem zárható ki a nem-kanonikus, szennyező cDS populáció, mely álpozitív eredményeket adhat [34,58].

Eredményeink továbbá rávilágítottak arra is, hogy a nagymértékű I-es típusú IFN választ indukáló TLR ligandok, így a CpG-A, szemben a CpG-B-vel nem képes kiváltani IL-1 β termelődést a pDS-ekben. Bár mindkét TLR9 ligand metilátlan ODN szekvencia, a CpG-A molekula 5' és 3' végén is poli-G motívumok találhatóak, melyek nagymértékben segítik a molekula aggregációját és tetramer képzését. Ilyen tetramer alakban a CpG-A molekula visszatartásra kerül a korai endoszómákban és TLR9-en felismerődve az IRF7 transzkripció faktor aktivációján keresztül főleg nagymennyiségű I-es típusú IFN szekréciónhoz vezet a pDS-ekben. A CpG-B teljes szekvenciája foszfotioát gerincből áll és a GpG-A-val ellentétben nem képes tetramereket formálni, így hamar eljut a késői endoszómákba, ahol főként NF- κ B aktiváción keresztül pro-inflammatórikus citokin termelődést tesz lehetővé és emellett csak

nagyon csekély mértékű I-es típusú IFN termelést képes indukálni a pDS-ekben [256]. Így feltételeztük, hogy a pDS-ek erős I-es típusú IFN termelő képessége is hozzájárulhat ahhoz, hogy ezen sejtekben a mieloid sejtekhez képest alacsonyabb az NLRP3 inflammaszóma aktivitás. Ha a pDS-eket rekombináns humán IFN- α -val vagy I-es típusú IFN-okat indukáló vírusokkal kezeltük elő, a pDS-ekben a korábban potens NLRP3 aktivátoroknak bizonyuló stimulátorok, úgymint a CpG-B vagy az *E. coli* sem voltak képesek nagyobb mértékű IL-1 β termelődést kiváltani, mely igazolta felvetésünket. Az irodalomban más sejtípusok esetében számos adat található arra nézve, hogy az I-es típusú IFN-ok milyen mechanizmusok révén tudják gátolni az NLRP3 aktivációt [227,257,266]. Ismert tény továbbá, hogy a vírusfertőzések után gyakoriak a bakteriális felülfertőzések, melynek háttérében részben a vírusok által aktivált IFN útvonal antibakteriális IL-1 β útvonalra gyakorolt gátló hatása állhat [266]. Azonban a baktérium ellenes immunválasz részeként termelődő IL-1 β eikozanoid lipid mediátorok, például a PGE2 termelődés fokozása révén szintén képes gátolni az I-es típusú IFN-ok szekrécióját [236]. Tehát az IL-1 β útvonal aktivációja is gátlólag hathat az I-es típusú IFN útvonalra, melyet mi is tapasztaltunk kísérleteink során, ugyanis megfigyeltük, hogy az IL-1 β jelenléte gátolja a CpG-A indukált IFN- α termelést pDS-ekben. Így súlyos bakteriális fertőzések után is kialakulhatnak virális felülfertőzések. Érdekes adat például, hogy a vírusos hepatitis kezelésére alkalmazott IFN- α/β terápia az esetek 60%-ában hatástalannak bizonyult, melynek háttérében az IL-1 β közvetített gyulladás állhatott, ugyanis az IL-1 β gátolta az IFN- α/β által aktivált STAT1 transzkripció faktort és csökkentette az antivirális fehérjék expresszióját a sejtekben [234]. Megfigyelték továbbá, hogy az ASC és a kaszpáz-1 hiányos DS-ekben, illetve makrofágokban megnő az I-es típusú IFN-ok szintje [299], illetve az NLRP3 vagy a kaszpáz-1 hiányos egerekben szintén nagyobb mértékű I-es típusú IFN válasz mérhető [300].

Az I-es típusú IFN és IL-1 β útvonalak közötti interakciók nemcsak patogén-indukált gyulladások során játszhatnak fontos szerepet, hanem különböző autoimmun kórképek patomechanizmusának szabályozásában is. Továbbá az I-es típusú IFN-ok NLRP3 inflammaszóma aktivációjára gyakorolt gátló hatása fontos terápiás megoldás is lehet bizonyos kórképek kezelésében. Például olyan SM betegek esetében, akiknél fokozott NLRP3 aktivitás detektálható, az inflammaszóma megnövekedett aktivitása visszaszorítható IFN- β terápiával, mely segít csökkenteni a betegek tüneteit [231]. Fontos kiemelni, hogy mind a pDS-ek, mind az NLRP3 receptorok túlműködése szerepet játszik különböző autoimmun betegségek patogenezisében és patomechanizmusában. Az NLRP3 különböző, egy nukleotidot érintő polimorfizmusait, melyek főként funkcionyerő mutációk, már leírták például SLE-ben, IBD-

ben, SM-ben, RA-ban, valamint psoriasis esetében is [301,302]. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a pDS-ek is szerepet játszhatnak a psoriasis patogenezisében, ugyanis a kóros sejtpusztulás következtében felszabaduló saját nukleinsavak a túltermelt LL37 kationos antimikrobiális peptidekkel komplexben a pDS-ek túlzott, perzisztens aktivitását és fokozott I-es típusú IFN termelését indukálják, ami elősegíti a T-sejt mediált autoimmun folyamatok kialakulását [303,304]. Így a psoriasis bizonyítottan magas IGS-sel jellemezhető [258]. Eredményeink alapján a psoriasisos betegek pDS-eit szignifikánsan alacsonyabb aktiváció indukált NLRP3 aktivitás jellemzi. Ez szintén alátámasztja hipotézisünket, miszerint a pDS-ek magas I-es típusú IFN útvonal aktivitása alacsony NLRP3 aktivitást eredményez, mivel az I-es típusú IFN-ok gátolják az NLRP3 útvonalat.

Az I-es típusú IFN-ok receptoraikhoz kapcsolódva képesek aktiválni a STAT1 transzkripciós faktort, mely számos olyan negatív regulátor fehérjének az expresszióját képes fokozni, mint például a CH25H, az IL-10, az IL-1Ra, az iNOS, a SOCS1, illetve a POP vagy COP fehérjék, melyek mRNS szinten gátolják az IL-1 β képződést, gátolják az NLRP3 aktivációjához szükséges másodlagos szignálokat vagy pedig közvetlenül interakcióba lépnek az NLRP3 inflammaszóma komponensekkel és gátolják azok összeszerelődését [227,231,257,266]. Az IFN-indukált IL-10 gátló hatása a pDS-ekben valószínűleg nem érvényesül, mivel irodalmi adatok alapján a pDS-ek nem képesek IL-10 termelésre [305]. Továbbá a pDS-ekre a nitrogén-monoxid szintézis sem jellemző, mivel az iNOS szintje nagyon alacsony bennük, így valószínűsíthető, hogy nitroziláción keresztül sem valósulhat meg az NLRP3 gátlása [306]. Ugyanakkor eredményeink alapján a humán pDS-ekben a CH25H, a SOCS1 és a COP1 expressziója nagymértékben fokozódik magas IFN választ kiváltó aktivációs szignál hatására. Továbbá megállapítottuk, hogy a magas IFN- α szinttel asszociált psoriasisos betegek PBMC-jében is szignifikánsan magasabb a CH25H, a SOCS1 és a COP1 expresszió. Így a pDS-ek magas I-es típusú IFN útvonal aktivitása miatt a CH25H gátolhatja az IL-1 β transzkripcióját, a SOCS1 az NLRP3 aktiválását, a COP1 pedig a kaspáz-1 aktiválódását [228,231,268].

Az NLRP3 inflammaszóma túlzott aktivitása szintén hozzájárulhat a psoriasis-asszociált gyulladáshoz [259,307,308,309], ennek megfelelően mi is emelkedett NLRP3, ASC, IL1B és kaspáz-1 expressziót figyeltünk meg, ha a betegek PBMC-jét vizsgáltuk. Külön vizsgálva a betegek CD14⁺ monocita populációját alapszinten magasabb inflammaszóma aktivitást figyeltünk meg, főként a hasított kaspáz-1 expresszió volt jelentős, szemben a pDS-ekkel. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a monociták a makrofágoknál is magasabb kaspáz-1 aktivitással rendelkeznek, ráadásul ezen sejtekben a kaspáz-1 enzim állandóan aktív is lehet

[288,310], így a mieloid sejtek jóval nagyobb kaszpáz-1 függő IL-1 β termelő kapacitással rendelkezhetnek a pDS-khez képest.

Továbbá hasonló aktivációs szignálok mellett a psoriasisos betegek monocitái esetében nem találtunk csökkent NLRP3 aktivitást, szemben a betegek pDS-eivel. Feltételezésünk szerint ez annak köszönhető, hogy a monociták esetében nem érvényesülhetnek annyira az I-es típusú IFN-ok NLRP3 aktivitásra gyakorolt gátló hatásai, mivel a pDS-ekhez képest a monociták I-es típusú IFN termelő kapacitása nagyságrendekkel kisebb [67,95]. Ezt alátámasztja, hogy kísérleteink során a monociták esetében a CpG-A is indukálta a pro-IL-1 β , a hasított IL-1 β és a hasított kaszpáz-1 expressziót szemben a pDS-ekkel. Ismert, hogy monocitákban a TLR aktiváció nem indukál vagy csak nagyon kis mértékben indukál I-es típusú IFN termelést [262–265]. Megjegyzendő, hogy szignifikánsan magasabb NLRP3 aktivitást sem tudtunk kimutatni a psoriasisos betegek aktivált monocitáiban az egészséges donorokhoz képest, holott irodalmi adatok alapján a psoriasisos betegek aktivált monocitái szignifikánsan nagyobb NLRP3 aktivitással jellemezhetőek, mely szintén hozzájárul a betegség patológiájához [259–261]. Valószínűleg kísérleteink során azért nem tudtuk detektálni ezt a megnövekedett NLRP3 aktivitást a betegek monocitáiban, mert a precízebb összehasonlítás érdekében a pDS-ekre szabott aktivációs szignálokat használtunk a monociták esetében is. Habár a monociták is kifejezik a TLR7 [311] és TLR9 [312–314] receptorokat, számukra nem az ezeken a receptorokon keresztüli aktiváció jelenti a legerősebb stimulációt. Továbbá a monociták esetében az állandó kaszpáz-1 aktivitásuk [288,310], illetve a kaszpáz-1 enzimük szekrécija [315,316] is megnehezíti az áramlási citometriával végzett intracelluláris protein analízist.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy a humán pDS-ek is kifejezik az NLRP3 útvonal komponenseit, melyek expresszióját a különböző aktivációs szignálok eltérő módon befolyásolják. Kimutattuk, hogy az NLRP3 funkcionálhat a humán pDS-ekben is, mivel primingot követően specifikus másodlagos aktivációs szignálok jelenlétében érett IL-1 β szekrécia is kiváltható a humán pDS-ekben. Ugyanakkor igazoltuk, hogy a pDS-ek NLRP3 aktivitása jóval alacsonyabb, mint egyéb mieloid sejteké, mely valószínűleg az alacsony bazális kaszpáz-1 expressziójuknak és a magas I-es típusú IFN útvonal aktivitásuknak köszönhető. Ugyanis olyan aktivációs stimulusk hatására, melyek nagymértékű I-es típusú IFN választ indukálnak a pDS-ekben, fokozódik az NLRP3 aktiváció-indukált IL-1 β szekréciónak gátló fehérjék expressziója is, melyek több ponton is gátolhatják az NLRP3 inflammaszóma aktivációt a pDS-ekben. Így a pDS-ek IL-1 β -mediált immunválasza főként olyan gyulladások során érvényesülhet, mely nem jár együtt fokozott I-es típusú IFN útvonal aktivitással.

Munkánk során tehát igazoltuk, hogy az antivirális immunválasz egyik meghatározó veleszületett immunsejtjében, a pDS-ekben is kifejeződik és funkcionál a citoszólikus NLR-ek két nagy csoportja, a regulatórikus és az inflammaszóma formáló NLR-ek. Eredményeink rámutatnak arra is, hogy az RLR-ek és a regulatórikus NLR-ek, illetve az I-es típusú IFN és IL-1 β útvonalak közötti interakciók fontos szabályozói lehetnek a patogén indukált gyulladási folyamatoknak és az autoimmun reakciókhoz kapcsolt immunválaszoknak is a pDS-ekben. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az abnormális RLR aktiváció miatt kialakuló kóros I-es típusú IFN termelés szerepet játszhat az autoimmun betegségek patogenezisében [317]. Az IFN-ok mellett az NLRP3 inflammaszóma túlműködésével asszociált fokozott IL-1 β produkció is hozzájárul a tolerancia áttöréséhez és az autoimmun betegségek kialakulásához [209–212]. Ezért a veleszületett immunitás negatív szabályozásának háttérében álló molekuláris mechanizmusok részletes feltárása és megértése hozzájárulhat a gyulladás által kiváltott autoimmun betegségek terápiáinak fejlesztéséhez. Másrészt a regulatórikus NLR-ek, melyek az antivirális jelátvitel molekuláris „fékjeként” szolgálnak, potenciális terápiás célpontok lehetnek a fertőzésekre adott immunválasz fokozására. Az IFN és az IL-1 β citokin termelés közötti egyensúly modulálását célzó beavatkozások pedig lehetőséget teremthetnek az effektív antivirális vagy antibakteriális válasz kialakulásának elősegítéséhez és így meghatározhatják az adott fertőzés kimenetelét.

VII. Új eredmények

- Kimutattuk, hogy a humán pDS-ekben az NLRC5 indukálható TLR9 stimuláció hatására, míg az NLRX1 konstitutívan expresszálódik.
- Az NLRC5 és az NLRX1 expressziójának gátlása a humán pDS-ekben fokozza az RLR-indukált I-es típusú IFN-ok expresszióját, de nem befolyásolja a TNF, az IL-6 és az IL-8 pro-inflammatórikus citokinek és kemokinek termelését.
- Az éretlen moDS-ek folyamatosan expresszálják az NLRX1-et és az NLRC5-öt, melyek expressziója fokozódik a monocita-moDS differenciáció során.
- Az NLRX1 expressziójának gátlása a humán moDS-ekben fokozza az RLR-indukált I-es típusú IFN expressziót, valamint a TNF, az IL-6 és az IL-8 pro-inflammatórikus citokinek és kemokinek termelését.
- Megfigyeléseink szerint az NLRC5 expressziójának gátlása a humán moDS-ekben nincs hatással az RLR-indukált I-es típusú IFN expresszióra, valamint a pro-inflammatórikus citokinek és kemokinek termelésére.
- Bizonyítottuk, hogy az NLRP3 inflammaszóma komponensei kifejeződnek a humán pDS-ekben.
- Azok a TLR ligandok és mikrobák, melyek erős NF- κ B indukáló képességgel rendelkeznek, nagyobb pro-IL-1 β szintet eredményeznek a priming során, összehasonlítva a főként IRF indukciót kiváltó szignálokkal a pDS-ekben.
- Az IL-1 β hasításához a priming szignál mellett másodlagos stimulusra is szükség van a humán pDS-ekben.
- A magas IFN- α szinttel asszociált betegségek és az I-es típusú IFN expressziót indukáló vírusok gátolják a humán pDS-ek IL-1 β -termelését az NLRP3 inflammaszómát gátló fehérjék mRNS expressziójának indukálásán keresztül.

VIII. Összefoglalás

A NOD-szerű receptorok (NLR) az immunrendszer erősen konzervált citoszólikus mintázat felismerő receptorai (PRR), melyek multifunkcionális tulajdonságuk révén nemcsak a kórokozók és a szöveti sérülések veszély jeleinek felismerésében vesznek részt, hanem a sejt szinte minden funkciójára hatással vannak, kezdve az autofágiától a transzkripció aktivációjáig. Rendkívül fontos tulajdonságuk továbbá, hogy képesek más PRR-ek jelátviteli útvonalaikat szabályozni, illetve multiprotein inflammaszóma komplexeket képezhetnek, ezzel pedig meghatározhatják mind az antibakteriális, mind az antivirális immunválasz kimenetelét. A plazmacitoid dendritikus sejtek (pDS) szervezetünk professzionális I-es típusú interferon (IFN) termelő sejtjei, melyek nagymértékű IFN termelő képességük révén egyedülálló antivirális aktivitással bírnak, ugyanakkor az autoimmun folyamatok patogenezisében is szerepet játszanak, így fontos terápiás célpontok. Azonban a pDS-ekben a citoszólikus PRR-ek szerepe és szabályozó mechanizmusai kevésbé feltártak. Így kutatásunk célja az volt, hogy a humán pDS-ekben is megvizsgáljuk a különböző NLR-ek szabályozó receptor interakcióit, illetve az inflammaszóma formáló képességüket. Kimutattuk, hogy az NLRX1 és az NLRC5 negatívan szabályozza a RIG-I-szerű receptorok (RLR) közvetített I-es típusú IFN termelést a pDS-ekben és a monocita eredetű dendritikus sejtekben (moDS) is, míg a pro-inflammatórikus citokin választ csak az NLRX1 gátolja és csak a moDS-ekben. Ezen eredményeink azt mutatják, hogy a sejtspecifikus hatás mellett, a regulatórikus NLR-ek főként azon sejtfunkciók esetében szolgálhatnak negatív visszacsatolási mechanizmusként, melyek jelentős mértékben meghatározzák az adott sejt profilját. Bizonyítottuk továbbá, hogy a regulatórikus NLR-ek mellett az NLRP3 inflammaszóma is funkcionál a pDS-ekben. Eredményeink alapján erős NF- κ B induktorokra és specifikus másodlagos, az inflammaszómát aktiváló jelekre is szükség van pDS-ekben a biológiailag aktív, érett IL-1 β szekréció kiváltásához. Azonban az NLRP3-függő IL-1 β szekréciós út vonal csak olyan gyulladáshoz vezető körülmények között lehet aktív a pDS-ekben, melyekben az I-es típusú IFN út vonal aktivitás nem dominál, mivel a magas I-es típusú IFN szinttel járó állapotok számos NLRP3 gátló génnek az expresszióját fokozzák. Munkánk során tehát sikerült új receptor interakciókat, illetve inflammaszóma aktivitást feltárunk egy olyan sejt típusban, melynek szerepe számos patológiás állapotban ismert. A pDS-ek és az NLR-ek nem megfelelő működése is lényeges kóroki tényezőnek minősül a fertőzések kimenetelét, illetve az autoimmun folyamatok kialakulását illetően, ezért a pDS-ek citoszólikus receptorainak és szabályozó mechanizmusainak átfogóbb megismerése új célpontokkal szolgálhat számos kórkép terápiás eljárásainak hatékonyabbá tételéhez.

Summary

NOD-like receptors (NLR) are highly conserved cytosolic pattern recognition receptors (PRR) of the immune system, which due to their multifunctional characteristics are not only involved in the recognition of pathogens and danger signals of tissue injury, but also affect almost all cellular functions, from autophagy to transcription activation. Furthermore, they have the ability to regulate signalling pathways of other PRRs and to form multiprotein inflammasome complexes, thus determining the outcome of both antibacterial and antiviral immune responses. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are the professional type I interferon (IFN) producing cells of our body. Due to their high IFN producing capacity, pDCs possess unique antiviral activity, and also play a role in the pathogenesis of autoimmune diseases, therefore they are important therapeutic targets. However, the role of cytosolic PRRs and their regulatory mechanisms are less understood in pDCs. Thus, the aim of our study was to investigate the regulatory receptor interactions of different NLRs and their inflammasome-forming capacity in human pDCs. We have shown that NLRX1 and NLRC5 negatively regulate the RIG-I-like receptor (RLR) mediated type I IFN production in pDCs and also in monocyte-derived dendritic cells (moDC), whereas the pro-inflammatory cytokine response is inhibited only by NLRX1 and only in moDCs. These results indicate that in addition to cell-specific effects, regulatory NLRs may serve as a negative feedback mechanism mainly for cellular functions that significantly determine the profile of the cell. We have also demonstrated that besides regulatory NLRs, the NLRP3 inflammasome functions in pDCs as well. Our results suggest that both strong NF- κ B inducers and specific secondary signals that activate the inflammasome are required in pDCs to induce biologically active, mature IL-1 β secretion. However, the NLRP3-dependent IL-1 β secretion pathway can only be active in pDCs under inflammatory conditions in which the activity of the type I IFN pathway is not dominant, as conditions with high type I IFN levels increase the expression of several NLRP3 inhibitory proteins. Thus, our work has revealed novel receptor interactions and inflammasome activity in a cell type with a known role in many pathological conditions. The dysfunction of pDCs and NLRs is considered to be an important pathogenic factor in the outcome of infections and the development of autoimmune diseases, therefore the more comprehensive understanding of the cytosolic receptors of pDCs and their regulatory mechanisms may provide new targets for more effective therapeutic approaches in a number of pathologies.

IX. Irodalomjegyzék

1. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(2):49. doi:10.1186/s13223-018-0278-1
2. Cabeza-Cabrerizo M, Cardoso A, Minutti CM, Pereira da Costa M, Reis e Sousa C. Dendritic Cells Revisited. *Annu Rev Immunol.* 2021;39(1):131-166. doi:10.1146/annurev-immunol-061020-053707
3. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-1162. doi:10.1084/jem.137.5.1142
4. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med.* 1974;139(2):380-397. doi:10.1084/jem.139.2.380
5. Andrés Castell-Rodríguez, Gabriela Piñón-Zárate, Miguel Herrera- Enríquez, Katia Jarquín-Yáñez, Iliana Medina-Solares. Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. In: Anirban Ghosh, ed. *Biology of Myelomonocytic Cells.* IntechOpen; 2017:Ch. 2. doi:10.5772/intechopen.68352
6. Hilligan KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cell Mol Immunol.* 2020;17(6):587-599. doi:10.1038/s41423-020-0465-0
7. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154(1):3-20. doi:10.1111/imm.12888
8. Segura E. Human dendritic cell subsets: An updated view of their ontogeny and functional specialization. *Eur J Immunol.* 2022;52(11):1759-1767. doi:10.1002/eji.202149632
9. Heath WR, Kato Y, Steiner TM, Caminschi I. Antigen presentation by dendritic cells for B cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2019;58:44-52. doi:10.1016/j.coi.2019.04.003
10. Audiger C, Rahman MJ, Yun TJ, Tarbell KV, Lesage S. The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol.* 2017;198(6):2223-2231. doi:10.4049/jimmunol.1601629
11. Fucikova J, Palova-Jelinkova L, Bartunkova J, Spisek R. Induction of Tolerance and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications. *Front Immunol.* 2019;10:2393. doi:10.3389/fimmu.2019.02393
12. Villar J, Segura E. Decoding the Heterogeneity of Human Dendritic Cell Subsets. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1062-1071. doi:10.1016/j.it.2020.10.002
13. Freitas-Silva R, Brelaz-de-Castro MC, Pereira VR. Dendritic cell-based approaches in the fight against diseases. *Front Immunol.* 2014;5:78. doi:10.3389/fimmu.2014.00078
14. Passeri L, Marta F, Bassi V, Gregori S. Tolerogenic Dendritic Cell-Based Approaches in Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8415. doi:10.3390/ijms22168415
15. Cifuentes-Rius A, Desai A, Yuen D, Johnston APR, Voelcker NH. Inducing immune tolerance with dendritic cell-targeting nanomedicines. *Nat Nanotechnol.* 2021;16(1):37-46. doi:10.1038/s41565-020-00810-2
16. Sadeghzadeh M, Bornehdeli S, Mohahammadrezakhani H, et al. Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art. *Life Sci.* 2020;254:117580. doi:10.1016/j.lfs.2020.117580
17. Espinar-Buitrago M, Muñoz-Fernández MA. New Approaches to Dendritic Cell-Based Therapeutic Vaccines Against HIV-1 Infection. *Front Immunol.* 2022;12:719664. doi:10.3389/fimmu.2021.719664
18. van der Sluis RM, Egedal JH, Jakobsen MR. Plasmacytoid Dendritic Cells as Cell-Based Therapeutics: A Novel Immunotherapy to Treat Human Immunodeficiency Virus Infection? *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:249. doi:10.3389/fcimb.2020.00249.
19. Anassi E, Ndefo UA. Sipuleucel-T (provenge) injection: the first immunotherapy agent (vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. *P T Peer-Rev J Formul Manag.* 2011;36(4):197-202.
20. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140(1):22-30. doi:10.1111/imm.12117

21. Collin M, Milne P. Langerhans cell origin and regulation. *Curr Opin Hematol.* 2016;23(1):28-35. doi:10.1097/MOH.0000000000000202
22. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol.* 2013;34(9):440-445. doi:10.1016/j.it.2013.06.001
23. Bigley V, Maisuria S, Cytlak U, et al. Biallelic interferon regulatory factor 8 mutation: A complex immunodeficiency syndrome with dendritic cell deficiency, monocytopenia, and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(6):2234-2248. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.044
24. Cytlak U, Resteu A, Pagan S, et al. Differential IRF8 Transcription Factor Requirement Defines Two Pathways of Dendritic Cell Development in Humans. *Immunity.* 2020;53(2):353-370.e8. doi:10.1016/j.immuni.2020.07.003
25. Nagasawa M, Schmidlin H, Hazekamp MG, Schotte R, Blom B. Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *Eur J Immunol.* 2008;38(9):2389-2400. doi:10.1002/eji.200838470
26. Schotte R, Nagasawa M, Weijer K, Spits H, Blom B. The ETS Transcription Factor Spi-B Is Required for Human Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *J Exp Med.* 2004;200(11):1503-1509. doi:10.1084/jem.20041231
27. Cytlak U, Resteu A, Bogaert D, et al. Ikaros family zinc finger 1 regulates dendritic cell development and function in humans. *Nat Commun.* 2018;9(1):1239. doi:10.1038/s41467-018-02977-8
28. Cisse B, Caton ML, Lehner M, et al. Transcription Factor E2-2 Is an Essential and Specific Regulator of Plasmacytoid Dendritic Cell Development. *Cell.* 2008;135(1):37-48. doi:10.1016/j.cell.2008.09.016
29. Balan S, Arnold-Schrauf C, Abbas A, et al. Large-Scale Human Dendritic Cell Differentiation Revealing Notch-Dependent Lineage Bifurcation and Heterogeneity. *Cell Rep.* 2018;24(7):1902-1915.e6. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.033
30. Sander J, Schmidt SV, Cirovic B, et al. Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity.* 2017;47(6):1051-1066.e12. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.024
31. Goudot C, Coillard A, Villani AC, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity.* 2017;47(3):582-596.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.016
32. Villani AC, Satija R, Reynolds G, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356(6335). doi:10.1126/science.aah4573
33. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 1995;182(2):389-400. doi:10.1084/jem.182.2.389
34. See P, Dutertre CA, Chen J, et al. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science.* 2017;356(6342). doi:10.1126/science.aag3009
35. Alcántara-Hernández M, Leylek R, Wagar LE, et al. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity.* 2017;47(6):1037-1050.e6. doi:10.1016/j.immuni.2017.11.001
36. Yun TJ, Igarashi S, Zhao H, et al. Human plasmacytoid dendritic cells mount a distinct antiviral response to virus-infected cells. *Sci Immunol.* 2021;6(58). doi:10.1126/sciimmunol.abc7302
37. Zhang H, Gregorio JD, Iwahori T, et al. A distinct subset of plasmacytoid dendritic cells induces activation and differentiation of B and T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(8):1988-1993. doi:10.1073/pnas.1610630114
38. Leylek R, Alcántara-Hernández M, Lanzar Z, et al. Integrated Cross-Species Analysis Identifies a Conserved Transitional Dendritic Cell Population. *Cell Rep.* 2019;29(11):3736-3750.e8. doi:10.1016/j.celrep.2019.11.042

39. Soltani S, Mahmoudi M, Farhadi E. Dendritic Cells Currently under the Spotlight; Classification and Subset Based upon New Markers. *Immunol Invest.* 2021;50(6):646-661. doi:10.1080/08820139.2020.1783289
40. Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GCM, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;9:3176. doi:10.3389/fimmu.2018.03176
41. Marmonti E, Oliva-Ramirez J, Haymaker C. Dendritic Cells: The Long and Evolving Road towards Successful Targetability in Cancer. *Cells.* 2022;11(19). doi:10.3390/cells11193028
42. Durand M, Walter T, Pirnay T, et al. Human lymphoid organ cDC2 and macrophages play complementary roles in T follicular helper responses. *J Exp Med.* 2019;216(7):1561-1581. doi:10.1084/jem.20181994
43. Chakarov S, Fazilleau N. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol Med.* 2014;6(5):590-603. doi:10.1002/emmm.201403841
44. Schlitzer A, McGovern N, Teo P, et al. IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b+ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity.* 2013;38(5):970-983. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.011
45. Leal Rojas IM, Mok WH, Pearson FE, et al. Human Blood CD1c+ Dendritic Cells Promote Th1 and Th17 Effector Function in Memory CD4+ T Cells. *Front Immunol.* 2017;8:971. doi:10.3389/fimmu.2017.00971
46. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med.* 2010;207(6):1247-1260. doi:10.1084/jem.20092140
47. Chu CC, Ali N, Karagiannis P, et al. Resident CD141 (BDCA3)+ dendritic cells in human skin produce IL-10 and induce regulatory T cells that suppress skin inflammation. *J Exp Med.* 2012;209(5):935-945. doi:10.1084/jem.20112583
48. Yu CI, Becker C, Metang P, et al. Human CD141+ Dendritic Cells Induce CD4+ T Cells To Produce Type 2 Cytokines. *J Immunol.* 2014;193(9):4335-4343. doi:10.4049/jimmunol.1401159
49. Zhang S, Kodys K, Li K, Szabo G. Human Type 2 Myeloid Dendritic Cells Produce Interferon- λ and Amplify Interferon- α in Response to Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology.* 2013;144(2):414-425.e7. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.034
50. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol.* 2014;15(1):98-108. doi:10.1038/ni.2768
51. Ashjaei K, Bublin M, Smole U, et al. Differential T-Helper Cell Polarization after Allergen-Specific Stimulation of Autologous Dendritic Cells in Polysensitized Allergic Patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2015;166(2):97-106. doi:10.1159/000375405
52. Unger WWJ, Laban S, Kleijwegt FS, van der Slik AR, Roep BO. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur J Immunol.* 2009;39(11):3147-3159. doi:10.1002/eji.200839103
53. Ito T, Yang M, Wang YH, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007;204(1):105-115. doi:10.1084/jem.20061660
54. Osorio F, Fuentes C, López MN, Salazar-Onfray F, González FE. Role of Dendritic Cells in the Induction of Lymphocyte Tolerance. *Front Immunol.* 2015;6:535. doi:10.3389/fimmu.2015.00535
55. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol.* 2018;9:1643. doi:10.3389/fimmu.2018.01643
56. Tel J, Schreiber G, Sittig SP, et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood.* 2013;121(3):459-467. doi:10.1182/blood-2012-06-435644
57. Bencze D, Fekete T, Pázmándi K. Type I Interferon Production of Plasmacytoid Dendritic Cells under Control. *Int J Mol Sci.* 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22084190
58. Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity.* 2019;50(1):37-50. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.027

59. Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(8):3012-3017. doi:10.1073/pnas.1117359109
60. Aiello A, Giannessi F, Percario ZA, Affabris E. The involvement of plasmacytoid cells in HIV infection and pathogenesis. *HIV Evasion Antivir Response.* 2018;40:77-89. doi:10.1016/j.cytogfr.2018.03.009
61. Li S, Wu J, Zhu S, Liu YJ, Chen J. Disease-Associated Plasmacytoid Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2017;8:1268. doi:10.3389/fimmu.2017.01268
62. Zhou B, Lawrence T, Liang Y. The Role of Plasmacytoid Dendritic Cells in Cancers. *Front Immunol.* 2021;12:749190. doi:10.3389/fimmu.2021.749190
63. Ye Y, Gaugler B, Mohty M, Malard F. Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. *Clin Transl Immunol.* 2020;9(5):e1139. doi:10.1002/cti2.1139
64. Panda SK, Kolbeck R, Sanjuan MA. Plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity. *Innate Immun.* 2017;44:20-25. doi:10.1016/j.coi.2016.10.006
65. Lennert K, Remmele W. Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen. *Acta Haematol.* 1958;19(2):99-113. doi:10.1159/000205419
66. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(12):1219-1226. doi:10.1038/ni1141
67. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science.* 1999;284(5421):1835-1837. doi:10.1126/science.284.5421.1835
68. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol.* 2000;1(4):305-310. doi:10.1038/79747
69. Tang F, Du Q, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in antiviral immunity and autoimmunity. *Sci China Life Sci.* 2010;53(2):172-182. doi:10.1007/s11427-010-0045-0
70. Zhan Y, Chow KV, Soo P, et al. Plasmacytoid dendritic cells are short-lived: reappraising the influence of migration, genetic factors and activation on estimation of lifespan. *Sci Rep.* 2016;6:25060. doi:10.1038/srep25060
71. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(8):471-485. doi:10.1038/nri3865
72. Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183(1):89-103. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05152.x
73. Lind NA, Rael VE, Pestal K, Liu B, Barton GM. Regulation of the nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(4):224-235. doi:10.1038/s41577-021-00577-0
74. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194(6):863-869. doi:10.1084/jem.194.6.863
75. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al. Human TLR10 Is a Functional Receptor, Expressed by B Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells, Which Activates Gene Transcription through MyD88. *J Immunol.* 2005;174(5):2942. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2942
76. Raieli S, Trichot C, Korniotis S, Pattarini L, Soumelis V. TLR1/2 orchestrate human plasmacytoid predendritic cell response to gram+ bacteria. *PLOS Biol.* 2019;17(4):e3000209. doi:10.1371/journal.pbio.3000209
77. Szabo A, Magyarics Z, Pazmandi K, Gopcsa L, Rajnavolgyi E, Bacsı A. TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(8):671-678. doi:10.1038/icb.2014.38
78. Fekete T, Bencze D, Szabo A, et al. Regulatory NLRs Control the RLR-Mediated Type I Interferon and Inflammatory Responses in Human Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2018;9:2314. doi:10.3389/fimmu.2018.02314
79. Bode C, Fox M, Tewary P, et al. Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon response by sensing DNA via the cGAS-STING signaling pathway. *Eur J Immunol.* 2016;46(7):1615-1621. doi:10.1002/eji.201546113

80. Bencze D, Fekete T, Pázmándi K. Correlation between Type I Interferon Associated Factors and COVID-19 Severity. *Int J Mol Sci.* 2022;23(18). doi:10.3390/ijms231810968
81. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity.* 2006;25(3):373-381. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.007
82. Lee AJ, Ashkar AA. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Front Immunol.* 2018;9:2061. doi:10.3389/fimmu.2018.02061
83. Gabriele L, Borghi P, Rozera C, et al. IFN-alpha promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood.* 2004;103(3):980-987. doi:10.1182/blood-2003-03-0981
84. Simmons DP, Wearsch PA, Canaday DH, et al. Type I IFN Drives a Distinctive Dendritic Cell Maturation Phenotype That Allows Continued Class II MHC Synthesis and Antigen Processing. *J Immunol.* 2012;188(7). doi:10.4049/jimmunol.1101313
85. Kiefer K, Oropallo MA, Cancro MP, Marshak-Rothstein A. Role of type I interferons in the activation of autoreactive B cells. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(5):498-504. doi:https://doi.org/10.1038/icb.2012.10
86. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med.* 2005;202(5):637-650. doi:10.1084/jem.20050821
87. Kuka M, De Giovanni M, Iannacone M. The role of type I interferons in CD4(+) T cell differentiation. *Immunol Lett.* 2019;215:19-23. doi:10.1016/j.imlet.2019.01.013
88. Gough DJ, Messina NL, Clarke CJP, Johnstone RW, Levy DE. Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling. *Immunity.* 2012;36(2):166-174. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.011
89. Hosseini S, Michaelsen-Preusse K, Grigoryan G, Chhatbar C, Kalinke U, Korte M. Type I Interferon Receptor Signaling in Astrocytes Regulates Hippocampal Synaptic Plasticity and Cognitive Function of the Healthy CNS. *Cell Rep.* 2020;31(7):107666. doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107666
90. Kawashima T, Kosaka A, Yan H, et al. Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon- β . *Immunity.* 2013;38(6):1187-1197. doi:10.1016/j.immuni.2013.02.024
91. Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity.* 2012;37(1):158-170. doi:10.1016/j.immuni.2012.04.011
92. Bradley KC, Finsterbusch K, Schnepf D, et al. Microbiota-Driven Tonic Interferon Signals in Lung Stromal Cells Protect from Influenza Virus Infection. *Cell Rep.* 2019;28(1):245-256.e4. doi:https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.105
93. Bencze D, Fekete T, Pázmándi K. Az I-es típusú interferonok jelentősége COVID-19-ben. *Immunológiai Szle 2061-0203.* 2021;13(2):26-49.
94. Haeryfar SMM. The importance of being a pDC in antiviral immunity: the IFN mission versus Ag presentation? *Trends Immunol.* 2005;26(6):311-317. doi:10.1016/j.it.2005.04.002
95. Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* 2006;107(6):2423-2431. doi:10.1182/blood-2005-07-2709
96. Yin Z, Dai J, Deng J, et al. Type III IFNs Are Produced by and Stimulate Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol.* 2012;189(6):2735-2745. doi:10.4049/jimmunol.1102038
97. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokines Dendritic Cells Immunol Rejection.* 2008;19(1):3-19. doi:10.1016/j.cytogfr.2007.10.006
98. Bao M, Liu YJ. Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells. *Protein Cell.* 2013;4(1):40-52. doi:10.1007/s13238-012-2104-8
99. McKenna Kelli, Beignon Anne-Sophie, Bhardwaj Nina. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Virol.* 2005;79(1):17-27. doi:10.1128/JVI.79.1.17-27.2005
100. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Science.* 2007;315(5817):1398-1401. doi:10.1126/science.1136880

101. Assil S, Coléon S, Dong C, et al. Plasmacytoid Dendritic Cells and Infected Cells Form an Interferogenic Synapse Required for Antiviral Responses. *Cell Host Microbe*. 2019;25(5):730-745.e6. doi:10.1016/j.chom.2019.03.005
102. Barchet W, Cella M, Odermatt B, Asselin-Paturel C, Colonna M, Kalinke U. Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med*. 2002;195(4):507-516. doi:10.1084/jem.20011666
103. Colina R, Costa-Mattioli M, Dowling RJO, et al. Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*. 2008;452(7185):323-328. doi:10.1038/nature06730
104. Honda K, Ohba Y, Yanai H, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*. 2005;434(7036):1035-1040. doi:10.1038/nature03547
105. Asselin-Paturel C, Brizard G, Chemin K, et al. Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med*. 2005;201(7):1157-1167. doi:10.1084/jem.20041930
106. Kim S, Kaiser V, Beier E, et al. Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2014;44(3):807-818. doi:10.1002/eji.201343806
107. Wimmers F, Subedi N, van Buuringen N, et al. Single-cell analysis reveals that stochasticity and paracrine signaling control interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat Commun*. 2018;9(1):3317. doi:10.1038/s41467-018-05784-3
108. Saitoh SI, Abe F, Kanno A, et al. TLR7 mediated viral recognition results in focal type I interferon secretion by dendritic cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):1592. doi:10.1038/s41467-017-01687-x
109. Musumeci A, Lutz K, Winheim E, Krug AB. What Makes a pDC: Recent Advances in Understanding Plasmacytoid DC Development and Heterogeneity. *Front Immunol*. 2019;10:1222. doi:10.3389/fimmu.2019.01222
110. Abbas A, Vu Manh TP, Valente M, et al. The activation trajectory of plasmacytoid dendritic cells in vivo during a viral infection. *Nat Immunol*. 2020;21(9):983-997. doi:10.1038/s41590-020-0731-4
111. Alculumbre SG, Saint-André V, Di Domizio J, et al. Diversification of human plasmacytoid predendritic cells in response to a single stimulus. *Nat Immunol*. 2018;19(1):63-75. doi:10.1038/s41590-017-0012-z
112. Fekete T, Sütö MI, Bencze D, et al. Human Plasmacytoid and Monocyte-Derived Dendritic Cells Display Distinct Metabolic Profile Upon RIG-I Activation. *Front Immunol*. 2018;9:3070. doi:10.3389/fimmu.2018.03070
113. Bencze D, Ágics B, Fekete T, Pázmándi K. A vírusok ellenségei: a humán plazmacitoid dendritikus sejtek. *Immunológiai Szle 2061-0203*. 2020;12(2):19-35.
114. Veckman V, Julkunen I. Streptococcus pyogenes activates human plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2008;83(2):296-304. doi:10.1189/jlb.0707457
115. Parcina M, Wendt C, Goetz F, et al. Staphylococcus aureus-Induced Plasmacytoid Dendritic Cell Activation Is Based on an IgG-Mediated Memory Response. *J Immunol*. 2008;181(6):3823. doi:10.4049/jimmunol.181.6.3823
116. Williams NL, Morris JL, Rush CM, Ketheesan N. Plasmacytoid dendritic cell bactericidal activity against Burkholderia pseudomallei. *Microbes Infect*. 2015;17(4):311-316. doi:10.1016/j.micinf.2014.12.007
117. Romani L, Bistoni F, Gaziano R, et al. Thymosin α 1 activates dendritic cells for antifungal Th1 resistance through Toll-like receptor signaling. *Blood*. 2004;103(11):4232-4239. doi:10.1182/blood-2003-11-4036
118. Dan JM, Wang JP, Lee CK, Levitz SM. Cooperative Stimulation of Dendritic Cells by Cryptococcus neoformans Mannoproteins and CpG Oligodeoxynucleotides. *PLOS ONE*. 2008;3(4):e2046. doi:10.1371/journal.pone.0002046
119. Ramirez-Ortiz ZG, Lee CK, Wang JP, Boon L, Specht CA, Levitz SM. A Nonredundant Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in Host Defense against the Human Fungal Pathogen Aspergillus fumigatus. *Cell Host Microbe*. 2011;9(5):415-424. doi:10.1016/j.chom.2011.04.007
120. Loures FV, Röhm M, Lee CK, et al. Recognition of Aspergillus fumigatus Hyphae by Human Plasmacytoid Dendritic Cells Is Mediated by Dectin-2 and Results in Formation of Extracellular Traps. *PLOS Pathog*. 2015;11(2):e1004643. doi:10.1371/journal.ppat.1004643

121. Hole Camaron R., Leopold Wager Chrissy M., Mendiola Andrew S., et al. Antifungal Activity of Plasmacytoid Dendritic Cells against *Cryptococcus neoformans* In Vitro Requires Expression of Dectin-3 (CLEC4D) and Reactive Oxygen Species. *Infect Immun.* 2016;84(9):2493-2504. doi:10.1128/IAI.00103-16
122. Labidi-Galy SI, Sisirak V, Meeus P, et al. Quantitative and Functional Alterations of Plasmacytoid Dendritic Cells Contribute to Immune Tolerance in Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 2011;71(16):5423-5434. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0367
123. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, et al. Dendritic Cell Infiltration and Prognosis of Early Stage Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7466-7474. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0684
124. Labidi-Galy SI, Treilleux I, Goddard-Leon S, et al. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *OncoImmunology.* 2012;1(3):380-382. doi:10.4161/onci.18801
125. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer.* 2012;118(9):2476-2485. doi:10.1002/cncr.26511
126. Aspod C, Leccia MT, Charles J, Plumas J. Plasmacytoid Dendritic Cells Support Melanoma Progression by Promoting Th2 and Regulatory Immunity through OX40L and ICOSL. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(6):402-415. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0114-T
127. Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, et al. Clinical significance of plasmacytoid dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells in melanoma. *J Transl Med.* 2015;13(1):9. doi:10.1186/s12967-014-0376-x
128. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(5):2610-2615. doi:10.1073/pnas.0337679100
129. Menon M, Blair PA, Isenberg DA, Mauri C. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 2016;44(3):683-697. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.012
130. Yao Y, Richman L, Morehouse C, et al. Type I Interferon: Potential Therapeutic Target for Psoriasis? *PLOS ONE.* 2008;3(7):e2737. doi:10.1371/journal.pone.0002737
131. Zhang L Juan. Type I Interferons Potential Initiating Factors Linking Skin Wounds With Psoriasis Pathogenesis. *Front Immunol.* 2019;10:1440. doi:10.3389/fimmu.2019.01440
132. Maeda T, Murata K, Fukushima T, et al. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol.* 2005;81(2):148-154. doi:10.1532/ijh97.04116
133. Chaperot L, Blum A, Manches O, et al. Virus or TLR Agonists Induce TRAIL-Mediated Cytotoxic Activity of Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Immunol.* 2006;176(1):248. doi:10.4049/jimmunol.176.1.248
134. Lui G, Manches O, Angel J, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PloS One.* 2009;4(9):e7111. doi:10.1371/journal.pone.0007111
135. Carmona-Sáez P, Varela N, Luque MJ, et al. Metagene projection characterizes GEN2.2 and CAL-1 as relevant human plasmacytoid dendritic cell models. *Bioinformatics.* 2017;33(23):3691-3695. doi:10.1093/bioinformatics/btx502
136. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
137. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):291. doi:10.1038/s41392-021-00687-0
138. Kaufmann SHE, Dorhoi A. Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity.* 2016;44(3):476-491. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.014
139. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent.* 2019;43(1):187. doi:10.1186/s42269-019-0227-2
140. Brown GD, Willment JA, Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(6):374-389. doi:10.1038/s41577-018-0004-8

141. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 2007;448(7152):501-505. doi:10.1038/nature06013
142. Zhang Z, Yuan B, Bao M, Lu N, Kim T, Liu YJ. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011;12(10):959-965. doi:10.1038/ni.2091
143. Radoshevich L, Dussurget O. Cytosolic Innate Immune Sensing and Signaling upon Infection. *Front Microbiol*. 2016;7:313. doi:10.3389/fmicb.2016.00313
144. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(9):537-551. doi:10.1038/s41577-020-0288-3
145. Onomoto K, Onoguchi K, Yoneyama M. Regulation of RIG-I-like receptor-mediated signaling: interaction between host and viral factors. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(3):539-555. doi:10.1038/s41423-020-00602-7
146. Motta V, Soares F, Sun T, Philpott DJ. NOD-Like Receptors: Versatile Cytosolic Sentinels. *Physiol Rev*. 2015;95(1):149-178. doi:10.1152/physrev.00009.2014
147. Bryant CE, Monie TP. Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity. *Open Biol*. 2(4):120015. doi:10.1098/rsob.120015
148. Fekete T, Bencze D, Biró E, Benkő S, Pázmándi K. Focusing on the Cell Type Specific Regulatory Actions of NLRX1. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3). doi:10.3390/ijms22031316
149. Coutermarsh-Ott S, Eden K, Allen IC. Beyond the inflammasome: regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure. *J Gen Virol*. 2016;97(4):825-838. doi:10.1099/jgv.0.000401
150. Zhang L, Mo J, Swanson KV, et al. NLRC3, a Member of the NLR Family of Proteins, Is a Negative Regulator of Innate Immune Signaling Induced by the DNA Sensor STING. *Immunity*. 2014;40(3):329-341. doi:10.1016/j.immuni.2014.01.010
151. Allen IC, Wilson JE, Schneider M, et al. NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- κ B Signaling. *Immunity*. 2012;36(5):742-754. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.012
152. Benko S, Magalhaes JG, Philpott DJ, Girardin SE. NLRC5 Limits the Activation of Inflammatory Pathways. *J Immunol*. 2010;185(3):1681. doi:10.4049/jimmunol.0903900
153. Cui J, Zhu L, Xia X, et al. NLRC5 Negatively Regulates the NF- κ B and Type I Interferon Signaling Pathways. *Cell*. 2010;141(3):483-496. doi:10.1016/j.cell.2010.03.040
154. Tong Y, Cui J, Li Q, Zou J, Wang HY, Wang RF. Enhanced TLR-induced NF- κ B signaling and type I interferon responses in NLRC5 deficient mice. *Cell Res*. 2012;22(5):822-835. doi:10.1038/cr.2012.53
155. Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, et al. NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*. 2008;451(7178):573-577. doi:10.1038/nature06501
156. Allen IC, Moore CB, Schneider M, et al. NLRX1 Protein Attenuates Inflammatory Responses to Infection by Interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF- κ B Signaling Pathways. *Immunity*. 2011;34(6):854-865. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.026
157. Rebsamen M, Vazquez J, Tardivel A, Guarda G, Curran J, Tschopp J. NLRX1/NOD5 deficiency does not affect MAVS signalling. *Cell Death Differ*. 2011;18(8):1387-1387. doi:10.1038/cdd.2011.64
158. Soares F, Tattoli I, Wortzman ME, Arnoult D, Philpott DJ, Girardin SE. NLRX1 does not inhibit MAVS-dependent antiviral signalling. *Innate Immun*. 2013;19(4):438-448. doi:10.1177/1753425912467383
159. Ling A, Soares F, Croitoru DO, et al. Post-transcriptional Inhibition of Luciferase Reporter Assays by the Nod-like Receptor Proteins NLRX1 and NLRC3*. *J Biol Chem*. 2012;287(34):28705-28716. doi:10.1074/jbc.M111.333146
160. Yao Y, Qian Y. Expression regulation and function of NLRC5. *Protein Cell*. 2013;4(3):168-175. doi:10.1007/s13238-012-2109-3
161. Tang F, Xu Y, Zhao B. NLRC5: new cancer buster? *Mol Biol Rep*. 2020;47(3):2265-2277. doi:10.1007/s11033-020-05253-5
162. Zhang L, Jiao C, Liu L, et al. NLRC5: A Potential Target for Central Nervous System Disorders. *Front Immunol*. 2021;12:704989. doi:10.3389/fimmu.2021.704989

163. Wang J quan, Liu Y ru, Xia Q, et al. Emerging Roles for NLRC5 in Immune Diseases. *Front Pharmacol.* 2019;10:1352. doi:10.3389/fphar.2019.01352
164. Kuenzel S, Till A, Winkler M, et al. The Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor NLRC5 Is Involved in IFN-Dependent Antiviral Immune Responses. *J Immunol.* 2010;184(4):1990. doi:10.4049/jimmunol.0900557
165. Meissner TB, Li A, Biswas A, et al. NLR family member NLRC5 is a transcriptional regulator of MHC class I genes. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(31):13794-13799. doi:10.1073/pnas.1008684107
166. Benkő S, Kovács EG, Hezel F, Kufer TA. NLRC5 Functions beyond MHC I Regulation—What Do We Know So Far? *Front Immunol.* 2017;8:150. doi:10.3389/fimmu.2017.00150
167. Arnoult D, Soares F, Tattoli I, Castanier C, Philpott DJ, Girardin SE. An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J Cell Sci.* 2009;122(17):3161-3168. doi:10.1242/jcs.051193
168. Hong M, Yoon S il, Wilson IA. Structure and Functional Characterization of the RNA-Binding Element of the NLRX1 Innate Immune Modulator. *Immunity.* 2012;36(3):337-347. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.018
169. Nagai-Singer MA, Morrison HA, Allen IC. NLRX1 Is a Multifaceted and Enigmatic Regulator of Immune System Function. *Front Immunol.* 2019;10:2419. doi:10.3389/fimmu.2019.02419
170. Pickering RJ, Booty LM. NLR in eXile: Emerging roles of NLRX1 in immunity and human disease. *Immunology.* 2021;162(3):268-280. doi:10.1111/imm.13291
171. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Mol Cell.* 2002;10(2):417-426. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
172. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell Discov.* 2020;6(1):36. doi:10.1038/s41421-020-0167-x
173. Keller M, Rüegg A, Werner S, Beer HD. Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell.* 2008;132(5):818-831. doi:10.1016/j.cell.2007.12.040
174. Monteleone M, Stow JL, Schroder K. Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *ICIS Award Rev.* 2015;74(2):213-218. doi:10.1016/j.cyto.2015.03.022
175. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8-27. doi:10.1111/imr.12621
176. Minkiewicz J, de Rivero Vaccari JP, Keane RW. Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia.* 2013;61(7):1113-1121. doi:10.1002/glia.22499
177. Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, et al. An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity.* 2012;36(3):464-476. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.001
178. Vladimer GI, Weng D, Paquette SWM, et al. The NLRP12 Inflammasome Recognizes *Yersinia pestis*. *Immunity.* 2012;37(1):96-107. doi:10.1016/j.immuni.2012.07.006
179. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell.* 2015;163(6):1428-1443. doi:10.1016/j.cell.2015.10.048
180. Zhu S, Ding S, Wang P, et al. Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells. *Nature.* 2017;546(7660):667-670. doi:10.1038/nature22967
181. Sefik E, Qu R, Junqueira C, et al. Inflammasome activation in infected macrophages drives COVID-19 pathology. *Nature.* 2022;606(7914):585-593. doi:10.1038/s41586-022-04802-1
182. Lei-Leston AC, Murphy AG, Maloy KJ. Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front Immunol.* 2017;8:1168. doi:10.3389/fimmu.2017.01168
183. Hatscher L, Amon L, Heger L, Dudziak D. Inflammasomes in dendritic cells: Friend or foe? *Immunol Lett.* 2021;234:16-32. doi:10.1016/j.imlet.2021.04.002
184. Jha Sushmita, Brickey W. June, Ting Jenny Pan-Yun. Inflammasomes in Myeloid Cells: Warriors Within. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1):5.1.07. doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0049-2016

185. Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol.* 2020;11:565924. doi:10.3389/fimmu.2020.565924
186. Crozat K, Vivier E, Dalod M. Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol Rev.* 2009;227(1):129-149. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00736.x
187. Worah K, Mathan TSM, Vu Manh TP, et al. Proteomics of Human Dendritic Cell Subsets Reveals Subset-Specific Surface Markers and Differential Inflammasome Function. *Cell Rep.* 2016;16(11):2953-2966. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.023
188. Sorrentino R, Terlizzi M, Di Crescenzo VG, et al. Human Lung Cancer-Derived Immunosuppressive Plasmacytoid Dendritic Cells Release IL-1 α in an AIM2 Inflammasome-Dependent Manner. *Am J Pathol.* 2015;185(11):3115-3124. doi:10.1016/j.ajpath.2015.07.009
189. Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci.* 2022;14:879021. doi:10.3389/fnagi.2022.879021
190. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(19):8041-8046. doi:10.1073/pnas.0611496104
191. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13). doi:10.3390/ijms20133328
192. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting Edge: NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol.* 2009;183(2):787. doi:10.4049/jimmunol.0901363
193. Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting Edge: TNF- α Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J Immunol.* 2009;183(2):792. doi:10.4049/jimmunol.0900173
194. Xing Y, Yao X, Li H, et al. Cutting Edge: TRAF6 Mediates TLR/IL-1R Signaling-Induced Nontranscriptional Priming of the NLRP3 Inflammasome. *J Immunol.* 2017;199(5):1561. doi:10.4049/jimmunol.1700175
195. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(8):477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0
196. Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res.* 2018;11:359-374. doi:10.2147/JIR.S141220
197. Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2018;564(7734):71-76. doi:10.1038/s41586-018-0761-3
198. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature.* 2016;530(7590):354-357. doi:10.1038/nature16959
199. Zheng X, Chen W, Gong F, Chen Y, Chen E. The Role and Mechanism of Pyroptosis and Potential Therapeutic Targets in Sepsis: A Review. *Front Immunol.* 2021;12:711939. doi:10.3389/fimmu.2021.711939
200. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189-195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001
201. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity.* 2019;50(4):778-795. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
202. Dinarello CA. The history of fever, leukocytic pyrogen and interleukin-1. *Temp Austin Tex.* 2015;2(1):8-16. doi:10.1080/23328940.2015.1017086
203. Chen L, Ozato K. Innate Immune Memory in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: Myeloid-Biased Differentiation and the Role of Interferon. *Front Immunol.* 2021;12:621333. doi:10.3389/fimmu.2021.621333
204. Pyrillou K, Burzynski LC, Clarke MCH. Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front Immunol.* 2020;11:613170. doi:10.3389/fimmu.2020.613170
205. Dinarello C, Novick D, Kim S, Kaplanski G. Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein. *Front Immunol.* 2013;4:289. doi:10.3389/fimmu.2013.00289

206. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(4):232-241. doi:10.1038/nrrheum.2010.4
207. Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH, et al. Inflammasome-Mediated Production of IL-1 β Is Required for Neutrophil Recruitment against *Staphylococcus aureus* In Vivo. *J Immunol.* 2007;179(10):6933. doi:10.4049/jimmunol.179.10.6933
208. Masumoto J, Zhou W, Morikawa S, et al. Molecular biology of autoinflammatory diseases. *Inflamm Regen.* 2021;41(1):33. doi:10.1186/s41232-021-00181-8
209. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med.* 2011;17(2):57-64. doi:10.1016/j.molmed.2010.11.001
210. Li Z, Guo J, Bi L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomed Pharmacother.* 2020;130:110542. doi:10.1016/j.biopha.2020.110542
211. Zhang Y, Yang W, Li W, Zhao Y. NLRP3 Inflammasome: Checkpoint Connecting Innate and Adaptive Immunity in Autoimmune Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:732933. doi:10.3389/fimmu.2021.732933
212. Yi YS. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2017;22(1):1-15. doi:10.4196/kjpp.2018.22.1.1
213. Xing J, Weng L, Yuan B, et al. Identification of a role for TRIM29 in the control of innate immunity in the respiratory tract. *Nat Immunol.* 2016;17(12):1373-1380. doi:10.1038/ni.3580
214. Xing J, Zhang A, Minze LJ, Li XC, Zhang Z. TRIM29 Negatively Regulates the Type I IFN Production in Response to RNA Virus. *J Immunol.* 2018;201(1):183. doi:10.4049/jimmunol.1701569
215. Agod Z, Fekete T, Budai MM, et al. Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells. *Redox Biol.* 2017;13:633-645. doi:10.1016/j.redox.2017.07.016
216. Fekete T, Ágics B, Bencze D, et al. Regulation of RLR-Mediated Antiviral Responses of Human Dendritic Cells by mTOR. *Front Immunol.* 2020;11(572960):572960. doi:10.3389/fimmu.2020.572960
217. Neerincx A, Lautz K, Menning M, et al. A Role for the Human Nucleotide-binding Domain, Leucine-rich Repeat-containing Family Member NLRC5 in Antiviral Responses*. *J Biol Chem.* 2010;285(34):26223-26232. doi:10.1074/jbc.M110.109736
218. Ranjan P, Singh N, Kumar A, et al. NLRC5 interacts with RIG-I to induce a robust antiviral response against influenza virus infection. *Eur J Immunol.* 2015;45(3):758-772. doi:10.1002/eji.201344412
219. Kumar H, Pandey S, Zou J, et al. NLRC5 Deficiency Does Not Influence Cytokine Induction by Virus and Bacteria Infections. *J Immunol.* 2011;186(2):994. doi:10.4049/jimmunol.1002094
220. Qin Yuwen, Xue Binbin, Liu Chunyan, et al. NLRX1 Mediates MAVS Degradation To Attenuate the Hepatitis C Virus-Induced Innate Immune Response through PCBP2. *J Virol.* 2017;91(23):e01264-17. doi:10.1128/JVI.01264-17
221. Barouch DH, Ghneim K, Bosche WJ, et al. Rapid Inflammasome Activation following Mucosal SIV Infection of Rhesus Monkeys. *Cell.* 2016;165(3):656-667. doi:10.1016/j.cell.2016.03.021
222. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, et al. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020;583(7816):459-468. doi:10.1038/s41586-020-2286-9
223. Ma Z, Hopcraft SE, Yang F, et al. NLRX1 negatively modulates type I IFN to facilitate KSHV reactivation from latency. *PLOS Pathog.* 2017;13(5):e1006350. doi:10.1371/journal.ppat.1006350
224. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):87-103. doi:10.1038/nri3787
225. Benveniste EN, Qin H. Type I Interferons as Anti-Inflammatory Mediators. *Sci STKE.* 2007;2007(416):pe70-pe70. doi:10.1126/stke.4162007pe70
226. Sciacca FL, Canal N, Grimaldi LM. Induction of IL-1 receptor antagonist by interferon beta: implication for the treatment of multiple sclerosis. *J Neurovirol.* 2000;6 Suppl 2:S33-37.
227. Guarda G, Braun M, Staehli F, et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity.* 2011;34(2):213-223. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.006

228. Reboldi A, Dang EV, McDonald JG, Liang G, Russell DW, Cyster JG. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1–driven inflammation downstream of type I interferon. *Science*. 2014;345(6197):679-684. doi:10.1126/science.1254790
229. Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, et al. Cutting Edge: Nitric Oxide Inhibits the NLRP3 Inflammasome. *J Immunol*. 2012;189(11):5113. doi:10.4049/jimmunol.1202479
230. Mishra BB, Rathinam VAK, Martens GW, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome–dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol*. 2013;14(1):52-60. doi:10.1038/ni.2474
231. Inoue M, Williams KL, Oliver T, et al. Interferon- β Therapy Against EAE Is Effective Only When Development of the Disease Depends on the NLRP3 Inflammasome. *Sci Signal*. 2012;5(225):ra38-ra38. doi:10.1126/scisignal.2002767
232. Indramohan M, Stehlik C, Dorfleutner A. COPs and POPs Patrol Inflammasome Activation. *Mech Inflammasome Act*. 2018;430(2):153-173. doi:10.1016/j.jmb.2017.10.004
233. Bedoya F, Sandler LL, Harton JA. Pyrin-Only Protein 2 Modulates NF- κ B and Disrupts ASC:CLR Interactions. *J Immunol*. 2007;178(6):3837. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3837
234. Tian Z, Shen X, Feng H, Gao B. IL-1 β Attenuates IFN- α β -Induced Antiviral Activity and STAT1 Activation in the Liver: Involvement of Proteasome-Dependent Pathway. *J Immunol*. 2000;165(7):3959. doi:10.4049/jimmunol.165.7.3959
235. Kohase M, Zhang YH, Lin JX, Yamazaki S, Sehgal PB, Vilcek J. Interleukin-1 can inhibit interferon-beta synthesis and its antiviral action: comparison with tumor necrosis factor. *J Interferon Res*. 1988;8(4):559-570. doi:10.1089/jir.1988.8.559
236. Mayer-Barber KD, Andrade BB, Oland SD, et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*. 2014;511(7507):99-103. doi:10.1038/nature13489
237. Labzin LI, Lauterbach MAR, Latz E. Interferons and inflammasomes: Cooperation and counterregulation in disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(1):37-46. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.010
238. Di Domizio J, Blum A, Gallagher-Gambarelli M, Molens JP, Chaperot L, Plumas J. TLR7 stimulation in human plasmacytoid dendritic cells leads to the induction of early IFN-inducible genes in the absence of type I IFN. *Blood*. 2009;114(9):1794-1802. doi:10.1182/blood-2009-04-216770
239. Xing F, Matsumiya T, Onomoto K, et al. Foreign RNA Induces the Degradation of Mitochondrial Antiviral Signaling Protein (MAVS): The Role of Intracellular Antiviral Factors. *PLOS ONE*. 2012;7(9):e45136. doi:10.1371/journal.pone.0045136
240. Israël A. The IKK complex, a central regulator of NF-kappaB activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(3):a000158. doi:10.1101/cshperspect.a000158
241. Kato H, Oh SW, Fujita T. RIG-I-Like Receptors and Type I Interferonopathies. *J Interferon Cytokine Res*. 2017;37(5):207-213. doi:10.1089/jir.2016.0095
242. Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response. *Immunity*. 2005;23(1):19-28. doi:10.1016/j.immuni.2005.04.010
243. Pichlmair Andreas, Schulz Oliver, Tan Choon-Ping, et al. Activation of MDA5 Requires Higher-Order RNA Structures Generated during Virus Infection. *J Virol*. 2009;83(20):10761-10769. doi:10.1128/JVI.00770-09
244. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006;441(7089):101-105. doi:10.1038/nature04734
245. Boltjes A, Van Wijk F. Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:131. doi:10.3389/fimmu.2014.00131
246. Cao W, Taylor AK, Biber RE, et al. Rapid Differentiation of Monocytes into Type I IFN-Producing Myeloid Dendritic Cells as an Antiviral Strategy against Influenza Virus Infection. *J Immunol*. 2012;189(5):2257. doi:10.4049/jimmunol.1200168
247. Qu C, Brinck-Jensen NS, Zang M, Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int J Infect Dis*. 2014;19:1-5. doi:10.1016/j.ijid.2013.09.023
248. Agod Z, Pazmandi K, Bencze D, et al. Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family 5 Enhances Autophagy and Fine-Tunes Cytokine Response in Monocyte-Derived Dendritic Cells

- via Stabilization of Interferon Regulatory Factor 8. *Front Immunol.* 2018;9:62. doi:10.3389/fimmu.2018.00062
249. Hanagata N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:515-531. doi:10.2147/IJN.S114477
 250. Kim JJ, Jo EK. NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection. *J Korean Med Sci.* 2013;28(10):1415-1423. doi:10.3346/jkms.2013.28.10.1415
 251. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):397-411. doi:10.1038/nri3452
 252. Greaney AJ, Leppla SH, Moayeri M. Bacterial Exotoxins and the Inflammasome. *Front Immunol.* 2015;6:570. doi:10.3389/fimmu.2015.00570
 253. Wang J, Takemura N, Saitoh T. Macrophage Response Driven by Extracellular ATP. *Biol Pharm Bull.* 2021;44(5):599-604. doi:10.1248/bpb.b20-00831
 254. Eder C. Mechanisms of interleukin-1 β release. *Vesicular Traffick Immune Cells.* 2009;214(7):543-553. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.007
 255. Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, et al. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood.* 2007;109(9):3856-3864. doi:10.1182/blood-2005-06-031377
 256. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2181-2195. doi:10.2147/IJN.S30197
 257. Stehlik C, Dorfleutner A. COPs and POPs: Modulators of Inflammasome Activity. *J Immunol.* 2007;179(12):7993. doi:10.4049/jimmunol.179.12.7993
 258. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon- α production. *J Exp Med.* 2005;202(1):135-143. doi:10.1084/jem.20050500
 259. Verma D, Fekri SZ, Sigurdardottir G, Bivik Eding C, Sandin C, Enerbäck C. Enhanced Inflammasome Activity in Patients with Psoriasis Promotes Systemic Inflammation. *J Invest Dermatol.* 2021;141(3):586-595.e5. doi:10.1016/j.jid.2020.07.012
 260. Yu N, Peng C, Chen W, et al. Circulating Metabolomic Signature in Generalized Pustular Psoriasis Blunts Monocyte Hyperinflammation by Triggering Amino Acid Response. *Front Immunol.* 2021;12:739514. doi:10.3389/fimmu.2021.739514
 261. Costa MC, Paixão CS, Viana DL, et al. Mononuclear Phagocyte Activation Is Associated With the Immunopathology of Psoriasis. *Front Immunol.* 2020;11:478. doi:10.3389/fimmu.2020.00478
 262. Bender AT, Tzvetkov E, Pereira A, et al. TLR7 and TLR8 Differentially Activate the IRF and NF- κ B Pathways in Specific Cell Types to Promote Inflammation. *ImmunoHorizons.* 2020;4(2):93. doi:10.4049/immunohorizons.2000002
 263. Congy-Jolivet N, Cenac C, Dellacasagrande J, et al. Monocytes are the main source of STING-mediated IFN- α production. *eBioMedicine.* 2022;80(104047). doi:10.1016/j.ebiom.2022.104047
 264. Kim TH, Kim CW, Oh DS, Jung HE, Lee HK. Monocytes Contribute to IFN- β Production via the MyD88-Dependent Pathway and Cytotoxic T-Cell Responses against Mucosal Respiratory Syncytial Virus Infection. *Immune Netw.* 2021;21(4):0.
 265. de Marcken M, Dhaliwal K, Danielsen AC, Gautron AS, Dominguez-Villar M. TLR7 and TLR8 activate distinct pathways in monocytes during RNA virus infection. *Sci Signal.* 2019;12(605):eaaw1347. doi:10.1126/scisignal.aaw1347
 266. Labzin LI, Lauterbach MAR, Latz E. Interferons and inflammasomes: Cooperation and counterregulation in disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(1):37-46. doi:10.1016/j.jaci.2016.05.010
 267. Kopitar-Jerala N. The Role of Interferons in Inflammation and Inflammasome Activation. *Front Immunol.* 2017;8:873. doi:10.3389/fimmu.2017.00873
 268. Druilhe A, Srinivasula SM, Razmara M, Ahmad M, Alnemri ES. Regulation of IL-1 β generation by Pseudo-ICE and ICEBERG, two dominant negative caspase recruitment domain proteins. *Cell Death Differ.* 2001;8(6):649-657. doi:10.1038/sj.cdd.4400881
 269. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses.* 2011;3(6):920-940. doi:10.3390/v3060920

270. Loo YM, Gale M. Immune Signaling by RIG-I-like Receptors. *Immunity*. 2011;34(5):680-692. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.003
271. Kell AM, Gale M. RIG-I in RNA virus recognition. *60th Anniv Issue*. 2015;479-480:110-121. doi:10.1016/j.virol.2015.02.017
272. Chaplin DD. Overview of the immune response. *2010 Primer Allerg Immunol Dis*. 2010;125(2, Supplement 2):S3-S23. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980
273. Kobayashi KS, Flavell RA. Shielding the double-edged sword: negative regulation of the innate immune system. *J Leukoc Biol*. 2004;75(3):428-433. doi:10.1189/jlb.0703321
274. Sharma N, Jha S. NLR-regulated pathways in cancer: opportunities and obstacles for therapeutic interventions. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(9):1741-1764. doi:10.1007/s00018-015-2123-8
275. Guo H, König R, Deng M, et al. NLRX1 Sequesters STING to Negatively Regulate the Interferon Response, Thereby Facilitating the Replication of HIV-1 and DNA Viruses. *Cell Host Microbe*. 2016;19(4):515-528. doi:10.1016/j.chom.2016.03.001
276. Liu YJ. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):275-306. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633
277. Hatscher L, Lehmann CHK, Purbojo A, et al. Select hyperactivating NLRP3 ligands enhance the TH1- and TH17-inducing potential of human type 2 conventional dendritic cells. *Sci Signal*. 2021;14(680):eabe1757. doi:10.1126/scisignal.abe1757
278. Groß CJ, Mishra R, Schneider KS, et al. K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity*. 2016;45(4):761-773. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.010
279. Budai MM, Tózsér J, Benkő S. Different dynamics of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production in GM-CSF- and M-CSF-differentiated human macrophages. *J Leukoc Biol*. 2017;101(6):1335-1347. doi:10.1189/jlb.3A0716-300RR
280. Ipseiz N, Pickering RJ, Rosas M, et al. Tissue-resident macrophages actively suppress IL-1 β release via a reactive prostanoid/IL-10 pathway. *EMBO J*. 2020;39(14):e103454. doi:10.15252/emj.2019103454
281. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(23):8067-8072. doi:10.1073/pnas.0709684105
282. Kovács EG, Alatshan A, Budai MM, Czimmerer Z, Bíró E, Benkő S. Caffeine Has Different Immunomodulatory Effect on the Cytokine Expression and NLRP3 Inflammasome Function in Various Human Macrophage Subpopulations. *Nutrients*. 2021;13(7). doi:10.3390/nu13072409
283. Schön M, Bong AB, Drewniok C, et al. Tumor-Selective Induction of Apoptosis and the Small-Molecule Immune Response Modifier Imiquimod. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2003;95(15):1138-1149. doi:10.1093/jnci/djg016
284. Kanneganti TD, Özören N, Body-Malapel M, et al. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*. 2006;440(7081):233-236. doi:10.1038/nature04517
285. Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M, et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*. 2014;510(7503):157-161. doi:10.1038/nature13199
286. Elliott EI, Sutterwala FS. Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev*. 2015;265(1):35-52. doi:10.1111/imr.12286
287. Long Y, Liu X, Tan X zhen, et al. ROS-induced NLRP3 inflammasome priming and activation mediate PCB 118- induced pyroptosis in endothelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2020;189:109937. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109937
288. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324-2335. doi:10.1182/blood-2008-03-146720
289. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation*. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36617-36622. doi:10.1074/jbc.M112.407130

290. Song N, Liu ZS, Xue W, et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol Cell*. 2017;68(1):185-197.e6. doi:10.1016/j.molcel.2017.08.017
291. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity*. 2016;44(4):833-846. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.012
292. Gaidt MM, Hornung V. Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells. *Innate Immun*. 2017;44:7-13. doi:10.1016/j.coi.2016.10.007
293. Zhang W, An EK, Hwang J, Jin JO. Mice Plasmacytoid Dendritic Cells Were Activated by Lipopolysaccharides Through Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Factor 2. *Front Immunol*. 2021;12:727161. doi:10.3389/fimmu.2021.727161
294. Ohradanova-Repic A, Machacek C, Fischer MB, Stockinger H. Differentiation of human monocytes and derived subsets of macrophages and dendritic cells by the HLDA10 monoclonal antibody panel. *Clin Transl Immunol*. 2016;5(1):e55. doi:10.1038/cti.2015.39
295. Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, et al. The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2000;14(15):2466-2476. doi:10.1096/fj.00-0031com
296. Yu CF, Peng WM, Oldenburg J, et al. Human Plasmacytoid Dendritic Cells Support Th17 Cell Effector Function in Response to TLR7 Ligation. *J Immunol*. 2010;184(3):1159. doi:10.4049/jimmunol.0901706
297. Rodriguez Rodrigues C, Cabrini M, Remes Lenicov F, et al. Epithelial Cells Activate Plasmacytoid Dendritic Cells Improving Their Anti-HIV Activity. *PLOS ONE*. 2011;6(12):e28709. doi:10.1371/journal.pone.0028709
298. Magyarics Z, Csillag A, Pazmandi K, Rajnavolgyi E, Bacsi A. Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening. *Cytometry A*. 2008;73A(3):254-258. doi:10.1002/cyto.a.20529
299. Corrales L, Woo SR, Williams JB, McWhirter SM, Dubensky TW, Gajewski TF. Antagonism of the STING Pathway via Activation of the AIM2 Inflammasome by Intracellular DNA. *J Immunol*. 2016;196(7):3191. doi:10.4049/jimmunol.1502538
300. Yu X, Du Y, Cai C, et al. Inflammasome activation negatively regulates MyD88-IRF7 type I IFN signaling and anti-malaria immunity. *Nat Commun*. 2018;9(1):4964. doi:10.1038/s41467-018-07384-7
301. Yang CA, Chiang BL. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;61:1-8. doi:10.1016/j.jaut.2015.05.001
302. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J*. 2016;57(1):5-14. doi:10.3349/ymj.2016.57.1.5
303. Kamata M, Tada Y. Dendritic Cells and Macrophages in the Pathogenesis of Psoriasis. *Front Immunol*. 2022;13:941071. doi:10.3389/fimmu.2022.941071
304. Lande R, Botti E, Jandus C, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nat Commun*. 2014;5(1):5621. doi:10.1038/ncomms6621
305. Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, et al. Macrophages and Myeloid Dendritic Cells, but Not Plasmacytoid Dendritic Cells, Produce IL-10 in Response to MyD88- and TRIF-Dependent TLR Signals, and TLR-Independent Signals. *J Immunol*. 2006;177(11):7551. doi:10.4049/jimmunol.177.11.7551
306. Morita R, Uchiyama T, Hori T. Nitric Oxide Inhibits IFN- α Production of Human Plasmacytoid Dendritic Cells Partly via a Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Pathway. *J Immunol*. 2005;175(2):806. doi:10.4049/jimmunol.175.2.806
307. Johansen C, Moeller K, Kragballe K, Iversen L. The Activity of Caspase-1 Is Increased in Lesional Psoriatic Epidermis. *J Invest Dermatol*. 2007;127(12):2857-2864. doi:10.1038/sj.jid.5700922
308. Tervaniemi MH, Katayama S, Skoog T, et al. NOD-like receptor signaling and inflammasome-related pathways are highlighted in psoriatic epidermis. *Sci Rep*. 2016;6(1):22745. doi:10.1038/srep22745
309. Ciężyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. The Role of NLRP1, NLRP3, and AIM2 Inflammasomes in Psoriasis: Review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11). doi:10.3390/ijms22115898

310. Kahlenberg JM, Dubyak GR. Differing caspase-1 activation states in monocyte versus macrophage models of IL-1 β processing and release. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):676-684. doi:10.1189/jlb.0404221
311. Azar P, Mejía JE, Cenac C, et al. TLR7 dosage polymorphism shapes interferogenesis and HIV-1 acute viremia in women. *JCI Insight.* 2020;5(12)(e136047). doi:10.1172/jci.insight.136047
312. Lacerte P, Brunet A, Egarnes B, Duchêne B, Brown JP, Gosselin J. Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:10. doi:10.1186/s13075-015-0901-1
313. Juarez E, Nuñez C, Sada E, Ellner JJ, Schwander SK, Torres M. Differential expression of Toll-like receptors on human alveolar macrophages and autologous peripheral monocytes. *Respir Res.* 2010;11(1):2. doi:10.1186/1465-9921-11-2
314. Fiola S, Gosselin D, Takada K, Gosselin J. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2010;185(6):3620-3631. doi:10.4049/jimmunol.0903736
315. Shamaa OR, Mitra S, Gavrilin MA, Wewers MD. Monocyte Caspase-1 Is Released in a Stable, Active High Molecular Weight Complex Distinct from the Unstable Cell Lysate-Activated Caspase-1. *PLOS ONE.* 2015;10(11):e0142203. doi:10.1371/journal.pone.0142203
316. Mitra S, Wewers MD, Sarkar A. Mononuclear Phagocyte-Derived Microparticulate Caspase-1 Induces Pulmonary Vascular Endothelial Cell Injury. *PLOS ONE.* 2016;10(12):e0145607. doi:10.1371/journal.pone.0145607
317. Kato H, Fujita T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. *Autoimmunity.* 2015;37:40-45. doi:10.1016/j.coi.2015.10.002

X. Kulcsszavak

veleszületett immunitás, dendritikus sejt, plazmacitoid dendritikus sejt, monocita eredetű dendritikus sejt, RLR, NLR, NLRX1, NLRC5, I-es típusú interferon, antivirális válasz, gyulladásoos válasz, NLRP3, IL-1 β , inflammaszóma, psoriasis, interakció, szabályozás, autoimmunitás

Keywords

innate immunity, dendritic cell, plasmacytoid dendritic cell, monocyte-derived dendritic cell, RLR, NLR, NLRX1, NLRC5, type I interferon, antiviral response, inflammatory response, NLRP3, IL-1 β , inflammasome, psoriasis, interaction, regulation, autoimmunity

XI. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/20/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

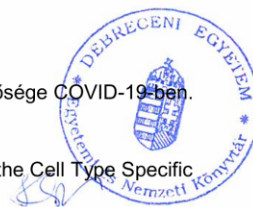
Jelölt: Bencze Dóra
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068399

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Bencze, D.**, Fekete, T., Pfliegler, V. P., Szőőr, Á., Csoma, E., Szántó, A., Tarr, T., Bácsi, A., Kemény, L. V., Veréb, Z., Pázmándi, K. L.: Interactions between the NLRP3-Dependent IL-1 β and the Type I Interferon Pathways in Human Plasmacytoid Dendritic Cells.
Int. J. Mol. Sci. 23 (20), 1-34, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms232012154>
IF: 6.208 (2021)
2. Fekete, T., **Bencze, D.**, Szabó, A., Csoma, E., Bíró, T., Bácsi, A., Pázmándi, K. L.: Regulatory NLRs Control the RLR-Mediated Type I Interferon and Inflammatory Responses in Human Dendritic Cells.
Front. Immunol. 9, 1-19, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.02314>
IF: 4.716

További közlemények

3. **Bencze, D.**, Fekete, T., Pázmándi, K. L.: Correlation between Type I Interferon Associated Factors and COVID-19 Severity.
Int. J. Mol. Sci. 23 (18), 1-26, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms231810968>
IF: 6.208 (2021)
4. **Bencze, D.**, Fekete, T., Pázmándi, K. L.: Az I-es típusú interferonok jelentősége COVID-19-ben.
Immunol. Szle. 13 (2), 4-27, 2021.
5. Fekete, T., **Bencze, D.**, Bíró, E., Benkő, S., Pázmándi, K. L.: Focusing on the Cell Type Specific Regulatory Actions of NLRX1.
Int. J. Mol. Sci. 22 (3), 1316, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22031316>
IF: 6.208





6. **Bencze, D.**, Fekete, T., Pázmándi, K. L.: Type I Interferon Production of Plasmacytoid Dendritic Cells under Control.
Int. J. Mol. Sci. 22 (8), 1-47, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22084190>
IF: 6.208
7. **Bencze, D.**, Fekete, T., Ágics, B., Pázmándi, K. L.: A vírusok ellenségei: a humán plazmacitoid dendritikus sejtek.
Immunol. Szle. 12 (2), 4-20, 2020.
8. Fekete, T., Ágics, B., **Bencze, D.**, Bene, K., Szántó, A., Tarr, T., Veréb, Z., Bácsi, A., Pázmándi, K. L.: Regulation of RLR-Mediated Antiviral Responses of Human Dendritic Cells by mTOR.
Front. Immunol. 11, 1-20, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.572960>
IF: 7.561
9. 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.03070>
IF: 4.716
10. Agod, Z., Pázmándi, K. L., **Bencze, D.**, Vereb, G., Bíró, T., Szabó, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A., Engel, P., Lányi, Á.: Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family 5 Enhances Autophagy and Fine-Tunes Cytokine Response in Monocyte-Derived Dendritic Cells via Stabilization of Interferon Regulatory Factor 8.
Front. Immunol. 9, 1-16, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00062>
IF: 4.716

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 46,541

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,924**

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



Debrecen, 2023.01.18.

XII. Köszönetnyilvánítás

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Pázmándi Kitti Lindának, aki megismertette velem a csapatmunka szépségét és biztosította szakmai fejlődésemet. Kiemelkedő szakmai tudása és fáradhatatlan iránymutatása nélkül ez az értekezés nem jöhetett volna létre. Külön köszönet illeti építő jellegű kritikáiért, mellyel arra sarkallt, hogy egyre jobb legyek.

Hálásan köszönöm munkacsoportunk nélkülözhetetlen tagjainak, Dr. Fekete Tündének és Berki-Pál Angélának a munkájukat és a segítségüket. Jó tanácsaikból és gyakorlatias meglátásaikból sokat tanulhattam az évek során.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani Prof. Dr. Bácsi Attilának, aki lehetőséget biztosított arra, hogy a PhD értekezésemhez szükséges kísérleteket az Immunológiai Intézetben végezhessem el.

Szeretnék köszönetet mondani az Immunológiai Intézet összes jelenlegi és volt munkatársának, akik szó szerint vérüket adták (volt aki többször is...) a kutatásunk sikeréért.

Köszönöm szüleim és barátaim támogatását, akik az évek során mindig mellettem álltak és töretlen érdeklődéssel követték tanulmányaimat.

Az értekezés az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, a Nemzeti Kutatás Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) FK-128294, a GINOP-2.3.2-15-2016-00050 projektek, illetve az MTA Bolyai János kutatási ösztöndíj, az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-5-170, valamint ÚNKP-19-3-I-DE-355 és ÚNKP-21-3-II-21 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság program finanszírozásában valósult meg.