

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**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

**Citoszólikus szenzorok aktivitásának és szabályozó mechanizmusaiknak vizsgálata
plazmacitoid dendritikus sejtekben**

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

Írta: **Bencze Dóra**, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Pázmándi Kitti Linda, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Kristóf Endre Károly, PhD

Dr. Danis Judit, PhD

A bírálóbizottság elnöke: Prof. Dr. Szabó Gábor, MTA doktora

A bírálóbizottság tagjai: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, MTA doktora

Dr. Sándor Noémi, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2023. december 04. 13:00 óra

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) aktiválódásán 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 gyulladásos 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 gyulladásos 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 válaszban 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 pDS-ek jelentősége

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

A pDS-ekben magas szinten expresszálódik az endoszomális nukleinsav érzékelő TLR7 és TLR9, melyek esszenciálisak a pDS-ek nagymértékű I-es típusú IFN termeléséhez. A TLR7 az egyszálú RNS-t, míg a TLR9 a metilálatlan CpG motívumot tartalmazó DNS-t ismeri fel. Továbbá a humán pDS-ek kifejezik a TLR1/2, TLR6 és TLR10 sejt felszíni receptorokat is. Ezenkívül a C-típusú lektin receptorok közül a mannóz és a dektin-1, 2, 3 receptorokat, illetve a CD32 scavenger receptort írták még le bennük. A membrán kötött receptorok mellett a pDS-ekben számos citoszólikus nukleinsav szenzor is funkcionál. Munkacsoportunk írta le, hogy a pDS-ekben aktív az RLR-ek közé tartozó RIG-I és a melanoma differenciáció asszociált fehérje (MDA) 5 is. Továbbá a cGAS-STING útvonal is funkcióképes ezen sejtekben. Az NLR-ek expressziós profilja a pDS-ekben azonban kevésbé ismert.

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

II.2 Citoszólikus szenzorok

A DS-ek, így a pDS-ek is fel vannak szerelve különböző PRR-ekkel. A PRR-eket elsősorban az antigén prezentáló sejtek fejezik ki, de más veleszületett immunsejtekben, illetve nem immunsejtekben is megtalálhatóak. A különböző PRR-ek az extra- és intracelluláris kórokozók patogén asszociált molekuláris mintázatait (PAMP), illetve a veszély asszociált molekuláris mintázatokat (DAMP) ismerik fel.

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 AIM2-szerű receptorok (ALR) és a STING-et aktiváló cGAS, DAI, illetve DDX41. Az RLR-ek a citoszólikus RNS-t, míg az ALR-ek és a STING-en keresztül szignalizáló fehérjék a citoszólikus DNS-t ismerik fel. 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.

A fentebb említett citoszólikus nukleinsav szenzorok közül munkacsoportunk főként az RLR-ek funkcióinak tanulmányozásával foglalkozik. Míg a cDS-ek alapszinten is kifejezik ezeket a receptorokat, addig a pDS-ekben expressziójuk aktiváció-függő. 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. A RIG-I és az MDA5 az RNS-kötés és oligomerizáció után kölcsönhatásba lépnek adaptor proteinjükkel, a mitokondriális antivirális szignalizációs fehérjével (MAVS). A MAVS ezután aktiválja a TANK-kötő kináz 1-et (TBK1) és az I κ B-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. 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.

Az NLR-ek szintén az intracelluláris szenzorok nagy családjához tartoznak. Egyedi funkciójuk alapján az NLR-ek négy alcsoportba sorolhatóak. Számos NLR képes multifehérje-komplexekeket, inflammaszómákat alkotni, melyek aktivációja a pro-IL-1 β és pro-IL-18 pro-inflammatórikus citokinek érett, biológiailag aktív formájának kialakulásához szükséges. 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. Az NLR-ek egy speciális alcsoportját alkotják az NLRC5 és a CIITA fehérjék, melyek enhanszoszómaként működnek, és az MHC gének transzkripcióját szabályozzák. Továbbá bakteriális stimulus hatására egyes NLR-ek, mint például a NOD1 és a NOD2, képesek az ATGL16L1 autofágiát moduláló fehérjét a sejtmembránhoz kötni, mely az autofagoszómák képződését segíti elő. Mivel a pDS-ek NLR expressziós profiljáról keveset

tudunk, munkacsoportunk e sejtek regulatórikus és inflammaszóma formáló NLR expresszióját kívánta feltárni.

II.2.1 Az NLRC5 és az NLRX1 regulatórikus NLR-ek

A regulatórikus 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. A regulatórikus NLR-ek közé tartoznak az NLRC5 és az NLRX1 fehérjék.

Míg az NLRC5 transzaktivátor szerepe viszonylag már jól dokumentált az MHC I. gének expressziójának szabályozásában, addig citoszólikus funkcióiról csak keveset tudunk, és az eddigi eredmények is ellentmondásosak. Az NLRC5 több jelátviteli útvonalat is szabályozhat, például a β -katenin, a 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. Az NLRC5 szignál útvonalakat szabályozó szerepét lentebb taglaljuk.

A mitokondriális NLRX1 lokalizációjától és interakciós partnereitől függően változatos funkciókkal rendelkezik. Az NLRX1 szabályozza az NF- κ B és az I-es típusú IFN jelátvitelt, befolyásolja a MAPK útvonalat, modulálja a reaktív oxigén gyök (ROS) termelést, valamint hatással van a főbb metabolikus útvonalakra, illetve az autofágiára és a sejthalálra is. 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 a szisztémás lupus erythematosus (SLE), a szklerózis multiplex (SM) és a gyulladásszerű bélbetegségek (IBD) kialakulását és progresszióját. Az NLRX1 hozzájárulhat a metabolikus rendellenességek patogeneziséhez is. 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 jelátviteli útvonalakat szabályozó szerepét lentebb részletezzük.

II.2.2 Az NLRP3 inflammaszóma

A kaspáz-1-et aktiváló inflammaszóma-közül az NLRP3 a legjobban jellemzett. Az NLRP3 egy citoszólikus fehérje, melyet számos sejttípus, például a neutrofilek, makrofágok, mikroglia sejtek, limfociták, hámsejtek, oszteoblasztok, neuronok, DS-ek is kifejeznek.

A kanonikus NLRP3 inflammaszóma aktiváció a legtöbb sejttípusban két lépésben valósul meg. Először az úgynevezett priming fázis során a citokin receptorok vagy más PRR-ek stimulálása aktiválja az NF- κ B és az aktivátor protein-1 útvonalakat, melyek transzkripciós szinten fokozzák az NLRP3, a pro-IL-1 β és a pro-IL-18 expresszióját. A legújabb kutatások szerint azonban a priming nemcsak a transzkripcióra hat, hanem az NLRP3 poszttranszlációs módosításait is szabályozza. 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. Az aktív kaszpáz-1 ezután hasítja a pro-IL-1 β -t és a pro-IL-18-at, és így kialakul ezen fehérjék biológiailag aktív, érett formája. A kaszpáz-1 emellett hasítja és aktiválja a membrán pórusokat képző gazdermin D fehérjét is, melynek hatására elindul a piroptózisnak nevezett programozott sejthalál forma. A sejt ozmotikus potenciáljának károsodása a membrán pórusokon keresztül az intracelluláris tartalom, többek között az IL-1 β és az IL-18 gyulladást okozó 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.

Az aktiváció hatására felszabaduló IL-1 β és IL-18 citokinek gyulladást kiváltó hatásai központi szerepet játszanak az antimikrobiális immunválaszokban. Azonban az NLRP3 polimorfizmusai az NLRP3 inflammaszóma abnormalis aktivációjához vezethetnek. A veleszületett immunsejtek fokozott IL-1 β és IL-18 szekréciója szisztémás gyulladást indukál, mely végül krónikus szövetkárosodásban és autoinflammatorikus vagy autoimmun betegségek kialakulásában teljesedik ki. Számos autoimmun betegség, például az SLE, a psoriasis, az SM, a rheumatoid arthritis (RA) vagy az IBD is összefüggésbe hozható az NLRP3 inflammaszóma túlműködésével.

II.3 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, ezért aktivációjukat szabályozni szükséges.

Munkacsoportunk korábban már feltárta az RLR aktiváció finomhangolásának néhány lehetséges mechanizmusát a 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. Emellett kimutattuk, hogy az oxidatív foszforiláció is elengedhetetlen a RIG-I agonistával kezelt pDS-ekben az IFN termeléshez. Igazoltuk továbbá, hogy az emlős rapamycin célpont aktivitás szintén szükséges a monocita eredetű DS-ek (moDS) és a pDS-ek RLR-indukált antivirális és gyulladáscsökkentő válaszához, mivel elengedhetetlen a TBK1 foszforilációjához. 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 a humán DS-ekben.

II.3.1 Receptor-receptor kölcsönhatásokon alapuló szabályozás

II.3.1.1 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 csendesítése károsítja az IFN- α expressziót Cytomegalovírus-fertőzést követően humán fibroblasztokban. 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. 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.

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. Ugyanis vírusfertőzést vagy a specifikus agonisták általi stimulációt követően az NLRC5 a MAVS-sal verseng a kötődésért, ami az IRF3 aktivációjának gátlásához vezet. 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. 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. Továbbá kimutatták, hogy az NLRC5 közvetlenül kötődhet a TBK1-hez is és gátolja a TBK1 közvetített IFN- β promóter aktivációt HEK293T sejtekben.

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

II.3.1.2 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 bizonyították, hogy az NLRX1 a RIG-I és valószínűleg az MDA5 indukált antivirális jelátvitel negatív szabályozója, mivel verseng ezen receptorokkal a MAVS megkötéséért. Továbbá *in vivo* körülmények között Allen és munkatársai bizonyították az NLRX1 negatív szabályozó szerepét a vírus indukált gyulladásban is az influenzafertőzés egérmodelljében. Eredményeik alapján az NLRX1 hiányos egerek habár gyorsabban eliminálták a vírust, fokozott IL-6 és IFN- β szinttel, súlyosabb tüdőkárosodással és morbiditással voltak jellemezhetőek.

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 PCBP2 fehérje 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. Továbbá az NLRX1-et számos más vírus is felhasználhatja a gazdaszervezet antivirális válaszána modulálására, és így a vírus replikációjának és túlélésének elősegítésére.

Ezzel szemben több munkacsoport arról számolt be, hogy az NLRX1 hiánya nem befolyásolja az RLR szignalizációt. Az NLRX1 hiánya nincs hatással az antivirális és a gyulladásoos válaszokra az NLRX1 hiányos egerekből származó csontvelő eredetű makrofágokban és egér embrionális fibroblasztokban Sendai vírus fertőzést követően. Továbbá az NLRX1 csendesített HEK293T sejtek Sendai vírus expozíciót követően normális I-es típusú IFN válasszal voltak jellemezhetőek.

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.

II.3.2 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 citokinek és fehérje interakciók is szabályozhatják. Az I-es típusú IFN-ok krónikus vírusos és bakteriális fertőzésekben immunszuppresszív tulajdonsággal bírnak. Emiatt „gyulladásgátlóként” is alkalmazzák őket, például az SM kezelésében. 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 expressziójának indukálásával, továbbá transzkripció jelátalakító és aktiváló (STAT) 1-függő módon csökkentik az IL-1 β szekréciót is. A gátlás mechanizmusát tekintve az IFN- β először indukálja az IL-10 expresszióját. Az IFN- β indukált IL-10 ezután az IL-10 receptorhoz kötődik, mely aktiválja a STAT3 jelátvitelt és gátolja a pro-IL-1 α és a pro-IL-1 β mRNS expressziót. Az IFN- β indukálja a koleszterol 25-hidroxiláz (CH25H) expresszióját is. Ez a gén egy enzimet kódol, mely a koleszterolt 25-hidroxi-koleszterollá (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. Továbbá az IFN-ok serkentik az iNOS expresszióját is. A termelődő nitrogén-monoxid pedig nitrolizálja az NLRP3-at, ami megakadályozza az NLRP3 oligomerizációját. 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.

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. A POP1 és a POP2 az ASC-hez kötődve gátolják az NLRP3 aktiválódását. Az öt humán COP ezzel szemben a kaspáz-1 aktivációt szabályozza.

Érdekes módon az IL-1 is képes gátolni az IFN útvonalat. A hepatocitákban az IL-1 β képes az IFN α/β indukált STAT1 foszforilációt gátolni egy proteaszóma-függő mechanizmuson

keresztül. Egy másik tanulmány is leírta az IFN- β termelés IL-1-függő gátlását humán fibroblasztokban. A gátlás hátterében a prosztoglandin E2 állhat. 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.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során a citoszólikus, reglátórikus 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 tártani 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 gyulladássos 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) 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) komplett RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich) tenyésztettük. A kísérletekhez a GEN2.2 sejteket eltávolítottuk a feeder sejtrétegről és 24 lyukú sejtenyésztő lemezekre osztottuk szét őket 5×10^5 sejt/500 μ l koncentrációban teljes RPMI 1640 médiumban. A sejtkultúrákat 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.

IV.2 Humán perifériás vérminták gyűjtése és feldolgoása

A psoriasisos betegek vérmintáit a Regeneratív Medicina és Celluláris Farmakológiai Kutató Laboratórium (Szegedi Tudományegyetem Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika) bocsátotta rendelkezésünkre, a vizsgálat etikai engedélyének adminisztratív száma 13740-5/2021/EÜIG és 4969; 90/2021-SZTE IKEB, protokoll kódja PSO-CELL-01 volt.

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 K₂EDTA-t tartalmazó lila kupakos BD Vacutainer® csövekbe (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A vért 1:1 arányban hígítottuk fiziológiás sóoldattal (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 komplett RPMI 1640 médiumba. A kísérletekhez a sejteket FACS csövekbe pipettáztuk 1×10^6 sejt/500 μ l médium koncentrációban.

IV.3 Primer sejtek izolálása és differenciálása

A primer sejteket humán 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, 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 Biotech, Bergish Gladbach, Németország) segítségével. A mágneses szeparálás után az izolált pDS populáció tisztaságát (>98%) áramlási citometriával erősítettük meg. A komplett RPMI 1640 tápfolyadékban felvett sejteket ezután 48 lyukú sejtenyésztő lemezekre osztottuk szét 5×10^5 sejt/500 μ l sűrűségben. A médium 50 ng/ml rekombináns humán IL-3-at (PeproTech EC, Brüsszel, Belgium) is tartalmazott. A sejteket 37 °C-os termosztátban, 5% CO₂ szaturáció mellett inkubáltuk.

A primer humán makrofágok differenciálásához 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 sejtenyésztő lemezekre osztottuk szét 5×10^5 sejt/500 μ l sűrűségben komplett RPMI 1640 tápfolyadékban. A médiumot 50 ng/ml rekombináns humán makrofág kolónia stimuláló faktorról (M-CSF, Peprotech) egészítettük ki. A sejteket 5 napig differenciáltattuk, majd a makrofágokat 250 ng/ml Ultrapure LPS-sel (*Escherichia 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 differenciálásához a frissen izolált monocitákat 24 lyukú sejtenyésztő lemezre pipettáztuk 10^6 sejt/ml sűrűségben komplett RPMI 1640 tápfolyadékban. A médium 80 ng/ml GM-CSF-t (Gentaur Molecular Products, London, UK) és 50 ng/ml IL-4-et (PeproTech) is tartalmazott. 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), siRNS nélkül elektroporáltuk (mock), NLRX1- vagy NLRC5-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 küvettákban (Bio-Rad

Laboratories GmbH, München, Németország) GenePulser Xcell eszköz (Bio-Rad) segítségével. A transzfekciót követően a sejteket a korábban leírtak szerint osztottuk szét a sejtenyészítő lemezekre aktivációhoz vagy differenciációhoz.

IV.5 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-vel (InvivoGen), a RIG-I/MDA5 agonistájával kezeltük a sejteket LyoVecTM transzfekciós 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. Az *E. coli* és a *Bacillus subtilis*-t LB agaron, a *Lactobacillus rhamnosus*-t MRSA táptalajon, a *Candida albicans*-t pedig YPD agaron tenyésztettük, a sejtszuspenziók koncentrációját Thoma-kamrában való

számolással végeztük. A vírusokat Dr. Csoma Esztertől (Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Tanszék, Debrecen, Magyarország) kaptuk, a vírusok tenyésztéséhez afrikai zöld majom vese epiteliális Vero sejt vonalat (ATCC-CCL-81, Manassas, VA, USA) használtunk, a szuszpenzió vírus titerének meghatározására pedig plakk assay-t végeztünk. A mikrobiális priming után a sejteket 20 μ M 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) adtuk 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.6 A sejtek áramlási citometriás vizsgálata

A moDS-ek fenotípusának analíziséhez áramlási citometriát használtunk. Az analízist az a sejtfelszíni markereikre specifikus 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 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 az inflammaszóma komponensekre specifikus antitestekkel inkubáltuk 30 percig. Mosás után a sejteket PE-konjugált szamar 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. A monocitákat CD14⁺ sejtekként azonosítottuk, a 400-600-as FSC régióban található BDCA4⁺ sejtekre pedig pDS-ként tekintettünk.

IV.7 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 és az Integrated DNA Technologies-től (Coralville, IA, USA) 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.8 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 tejpport tartalmazó TBS Tween pufferral (50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4) blokkoltuk. A membránokat a vizsgált fehérjékre specifikus antitestekkel inkubáltuk 1:10000 hígításban. A β -aktint (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.9 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 kitékkel (mind BD Biosciences) határoztuk meg. Az IFN- α és az IFN- β szintjét a VeriKineTM Human Interferon Alpha és az Interferon Beta ELISA kiték (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.10 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 gyulladásoos válaszában

V.1.1 Az NLRC5 és az NLRX1 expresszió vizsgálata aktiválatlan és TLR9 liganddal, CpG-A-val aktivált humán GEN2.2 pDS sejtvonalon és a primer pDS-ekben

Hogy feltárjuk milyen interakciók alakulhatnak ki az NLR és RLR receptorok között, első lépésként e receptorok expressziós mintázatát vizsgáltuk meg az aktiválatlan és a CpG-A-val aktivált sejtekben. Mivel a primer humán pDS-ek csak nagyon alacsony százalékban találhatóak meg a perifériás vérben, ezért kísérleteink nagy részét a GEN2.2 humán pDS sejtvonalon végeztük. Eredményeink alapján az NLRC5 nem fejeződik ki az aktiválatlan sejtekben, azonban jelentősen fokozódik a szintje CpG-A kezelés hatására. Ezzel szemben az NLRX1 konstitutívan jelen van a sejtekben. Az RLR útvonalat vizsgálva, fokozott RIG-I és MDA5 expressziót tapasztaltunk a CpG-A kezelés hatására, a MAVS adaptor fehérje szintje viszont csökkent. A TBK1-et, a MAVS-IFN jelátviteli útvonal kulcsfontosságú szabályozó molekuláját nem befolyásolta a CpG-A stimuláció. Hasonló eredményeket kaptunk a frissen izolált primer humán pDS-ek esetében is.

V.1.2 Az NLRC5 és az NLRX1 szerepének vizsgálata a GEN2.2 sejtek RLR-indukált I-es típusú IFN, illetve pro-inflammatórikus válaszában

Kíváncsiak voltunk arra, hogy az NLR-ek vajon képesek-e szabályozni a pDS-ek RIG-I-közvetített antivirális válaszait, ezért siRNS-mediált géncsendesítést végeztünk. Az alkalmazott siRNS-ek szignifikánsan csökkentették (>80%) az NLRC5 és az NLRX1 fehérjék szintjét az aktiválatlan és az aktivált sejtekben. Eredményeink alapján az siRNS-transzfekció nem változtatta meg az RLR jelátviteli fehérjék (RIG-I, MDA5, MAVS) expressziós mintázatát sem.

A 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 I-es típusú IFN termelést az 5'ppp-dsRNS kezelést követően. Ez arra utal, hogy mind az NLRC5, mind az NLRX1 negatív szabályozó szerepet játszik a humán pDS-ek RIG-I-közvetített antivirális válaszában. Az I-es típusú IFN-okkal ellentétben a TNF, az IL-6 és az IL-8 szekrécióját nem befolyásolta az NLRC5 vagy az NLRX1 csendesítése. A RIG-I stimuláció nem indukálta az I κ B α degradációját sem. Ez arra utalhat, hogy a pDS-ekben a RIG-I elsősorban az I-es típusú IFN-ok termelését indukálja a pro-inflammatórikus citokinekével szemben. Hasonló kísérletekben a CpG-A előkezeltet követően a sejteket nagy molekulású polyI:C/LyoVec-kel stimuláltuk, melyet főként az MDA5 ismer fel. Az NLRC5 és az NLRX1

depléciója növelte az I-es típusú IFN-ok polyI:C indukált szekrécióját is, azonban nem befolyásolta a pro-inflammatórikus citokinek termelését.

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. A sejtek VSV-indukált I-es típusú IFN termelését mind az NLRC5, mind az NLRX1 csendesítése fokozta, míg a pro-inflammatórikus citokinek termelését nem befolyásolta egyik NLR depléciója sem. Ezek alapján elmondható, hogy az NLRC5 és az NLRX1 is negatív szabályozója lehet a humán pDS-ek RLR-indukált I-es típusú IFN válaszában, viszont nem játszanak szerepet a pDS-ek RLR aktiváció mediált pro-inflammatórikus citokin és kemokin válaszaiban.

V.1.3 A moDS-ek NLRC5 és NLRX1 expressziós profiljának vizsgálata

Hogy megvizsgáljuk eredményeink sejtípus specifikusak-e, kísérleteinket megismételtük moDS-ekkel is. Humán vérből izolált CD14⁺ monocitákból GM-CSF és IL-4 jelenlétében *in vitro* moDS-eket differenciáltattunk. Eredményeink alapján az NLRC5 és az NLRX1 szintje fokozatos emelkedést mutat a moDS-ek differenciálódása során. Hasonlóképpen, a RIG-I, az MDA5, illetve a MAVS és a TBK1 szintje is fokozódik a monocita-moDS differenciáció során.

A monocitákat NLRC5 vagy NLRX1 specifikus siRNS-ekkel transzfektáltuk, nagyfokú expresszió csökkenést tapasztaltunk mindkét NLR esetében, a csendesítés pedig nem befolyásolta a RIG-I, az MDA5 és a MAVS expresszióját sem az éretlen 5 napos moDS-ekben. Eredményeink alapján az NLR-ek hiánya nem befolyásolja a moDS-ek differenciálódási folyamatait, az 5 napos moDS-ek CD14 pozitívak, CD209 negatívak voltak. A DS-ekre jellemző sejt felszíni markerek (CD1a, CD1c és CD11c) kifejeződésére és a moDS-ek életképességére se volt hatással a transzfekció, ezt 7-AAD festéssel igazoltuk.

V.1.4 Az NLRX1 és az NLRC5 szabályozó szerepének feltárása a moDS-ek RLR-közvetített antivirális és pro-inflammatórikus válaszában

A transzfekciót követően az aktiváltan moDS-eket az 5. napon 5'ppp-dsRNS-sel stimuláltuk. A RIG-I indukált I-es típusú IFN választ nem befolyásolta az NLRC5 csendesítése, míg az NLRX1 csendesítése fokozta azt. Az NLRC5 csendesítése nem befolyásolta a pro-inflammatórikus citokinek szekrécióját a moDS-ek esetében sem. Ugyanakkor a pro-inflammatórikus válasz fokozódott az NLRX1 hiányos sejtekben, ezzel összhangban fokozott NF- κ B aktivitást detektáltunk. A nagy molekulású polyI:C-LyoVec komplex is indukálta az I-es típusú IFN-ok és a pro-inflammatórikus citokinek termelődését a moDS-ekben.

A moDS-ekben a VSV is alacsony koncentrációban alkalmazva (MOI 1) I-es típusú IFN és pro-inflammatórikus citokin termelést indukált, melyet az NLRX1 depléciója fokozott, az NLRC5 hiánya pedig nem befolyásolt. 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 nincs szabályozó szerepe ezekben a folyamatokban. Tehát az NLRX1 és az NLRC5 is képes lehet szabályozni az RLR-mediált I-es típusú IFN, illetve pro-inflammatórikus válaszokat a humán DS-ekben, ugyanakkor szabályozó szerepük sejtspecifikus lehet.

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 és primer pDS-ekben

Először a GEN2.2 sejtekben térképeztük fel az NLRP3 inflammaszóma komponensek alapszintű, illetve aktiváció indukált kifejeződésének kinetikáját. Eredményeink alapján az NLRP3 receptor, az ASC, illetve a pro-kaspáz-1 alapszinten is detektálható a sejtekben, ugyanakkor a pro-IL-1 β csak nagyon kis mértékben fejeződik ki aktivációs szignál nélkül. Amikor a GEN2.2 sejteket a TLR receptorok szintetikus ligandjaival, illetve élő *E. coli* baktériummal aktiváltuk, azt tapasztaltuk, hogy a különböző aktivátorok eltérő módon befolyásolják az inflammaszóma komponensek expressziós szintjét. A legnagyobb különbséget a két TLR9 ligand, a CpG-A és a CpG-B pro-IL-1 β termelődést indukáló képességében tapasztaltuk. 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. A TLR7 liganddal, Imiquimoddal aktiválva a sejteket a pro-IL-1 β expresszió elnyújtott kinetikát mutatott. Hasonlóan a CpG-B-hez, az *E. coli* is nagymértékű pro-IL-1 β termelődést indukált. Eredményeink alapján tehát a CpG-B és az *E. coli* bizonyult a legjobb priming szignálnak a sejtvonal esetében.

A primer humán pDS-ek esetében is hasonló alapszintű és aktivációs profilt láttunk. Az NLRP3, az ASC és a pro-kaspáz-1 is alapszinten kifejeződik majdnem a teljes pDS populációban. Ugyanakkor aktivációs szignál nélkül a hasított kaspáz-1, a pro-IL-1 β és a hasított-IL-1 β expresszió elenyésző volt a sejtekben hasonlóan a sejtvonalhoz. A primer sejtekben is a pro-IL-1 β megjelenése főként a CpG-B és Imiquimod előkezelés után volt detektálható.

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

A következő lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy a pDS-ek képesek-e hasítani és átalakítani az inaktív pro-IL-1 β -t annak érett formájává. A CpG-B-vel előkezelt sejtekben másodlagos aktivációs szignálként ATP-t, MSU-t, alumínium-hidroxidot, nigericint, illetve a mitokondriális ROS termelést fokozó AMA-t alkalmaztunk. Önmagában a CpG-B-vel történő aktiváció az IL-1 β hasított formájának létrehozásához nem volt elegendő. A pDS-ek esetében csak a kálium ionofórként működő bakteriális toxin, a nigericin bizonyult erőteljes másodlagos szignálnak. A pDS-ekben ATP jelenlétében nem tapasztaltunk NLRP3 inflammaszóma aktivációt, mivel a sejtek nem fejezik ki a P2X7 receptort. Mivel csak a nigericin indukálta szignifikáns módon az IL-1 β hasított formájának megjelenését, a további kísérleteinkben ezt a bakteriális toxint alkalmaztunk másodlagos szignálként. Az Imiquimod előkezelés is érett IL-1 β szekréciót eredményezett nigericin jelenlétében, ugyanakkor a CpG-A nigericinnel együtt alkalmazva sem bizonyult az NLRP3 útvonalat aktiváló szignálnak. 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. Mivel a pDS-ek IL-1 β szekréciója a specifikus NLRP3 inhibitor jelenlétében gátolható volt, 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. A kaszpáz-1 specifikus gátlószere szignifikánsan csökkentette a CpG-B-vel és az Imiquimoddal előkezelt pDS-ek nigericin indukált IL-1 β szekrécióját. Továbbá mindkét gátlószer alkalmazása esetén jelentős mértékben csökkent a kaszpáz-1 hasítódása során keletkező p20 alegység szintje, mely arra utal, hogy a sejtvonalban az érett IL-1 β szekrécióhoz valóban szükséges az NLRP3 inflammaszóma aktivációja, ami a pro-kaspáz-1 hasításához vezet. A primer sejtek esetében is a CpG-B, illetve Imiquimod előkezelés nigericin expozícióval kombinációban eredményezett csak inflammaszóma aktivációt, míg a CpG-A gyenge aktivációs szignálnak bizonyult. Tehát 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.

V.2.3 A pDS-ek NLRP3 inflammaszóma aktivitásának vizsgálata I-es típusú IFN jelenlétében

Mivel a TLR9 receptor két ligandja eltérő mértékben váltott ki IL-1 β termelést a pDS-ekben, feltételeztük, hogy ez a különbség a két ligand különböző I-es típusú IFN termelést indukáló képességéből adódik. A CpG-A nagy mennyiségű IFN- α szekréciót eredményezett a sejtekben, ezzel szemben a CpG-B ilyen irányú hatása elhanyagolható. Több sejttípus esetén is

leírták, hogy az IFN indukált fehérjék gátolhatják az inflammaszóma aktivációját. Ezért a CpG-B-vel történő pDS aktivációt megismételtük IFN- α jelenlétében is. Az pro- és az érett IL-1 β gátolható volt az IFN- α citokin jelenlétében a GEN2.2 sejtekben. Így elmondható, hogy az I-es típusú IFN-ok a pDS-ekben is gátolják az 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. Ez arra utal, hogy az I-es típusú IFN és az IL-1 β útvonalak között kölcsönös negatív interakció áll fenn.

V.2.4 A fokozott I-es típusú IFN termelődést kiváltó vírusok NLRP3 inflammaszóma aktivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata humán pDS-ekben

Ezután megvizsgáltuk, hogy a magas I-es típusú IFN termelést eredményező vírusok a bakteriális stimulusokhoz képest milyen mértékben képesek indukálni a pDS-ek pro-IL-1 β termelését. A GEN2.2 sejteket RNS és DNS vírusokkal (VSV és HSV), illetve *E. coli*-val kezeltük. Az RNS és a DNS vírus is magas IFN- α szekréciót eredményezett az *E. coli*-hoz képest, azonban az *E. coli*-val szemben a vírusok alig váltottak ki pro-IL-1 β termelődést. Ezt követően megvizsgáltuk, hogy a vírusok jelenléte befolyásolja-e a pDS-ekben az *E. coli* indukált IL-1 β termelést. Eredményeink alapján a vírusokkal történő előkezelés szignifikánsan csökkentette az *E. coli*-indukált pro-IL-1 β kifejeződést, illetve az érett IL-1 β koncentrációja is alacsonyabb volt. Eredményeinket primer pDS-ekkel is validáltuk, áramlási citometria segítségével intracelluláris protein festést alkalmazva. A vírusokkal történő előkezelés gátló hatása a primer pDS-ekben is megfigyelhető volt. 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.

V.2.5 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 a magas IFN szinttel asszociált plakk típusú psoriasisban szenvedő betegek pDS-eiben is megvizsgáltuk az IL-1 β útvonal aktivitását, mivel a pDS-ek túlműködése és az I-es típusú IFN-ok túlermelése is szerepet játszik a betegség patogenezisében. Ennek megfelelően a betegek szérum mintáiban magasabb IFN- α szintet mértünk, illetve az IL-1 β , TNF és IL-6 koncentráció is emelkedett volt. A betegek teljes PBMC-jét vizsgálva az

NLRP3, az *ASC*, a *kaspáz-1* és az *IL1B* mRNS-ek fokozott expresszióját figyeltük meg, ugyanakkor a betegek pDS populációján belül csökkent alapszintű *NLRP3* útvonal aktivitást figyeltünk meg az egészséges egyének pDS-eihez képest. A psoriasisos betegek pDS-eiben a CpG-B és az Imiquimod kezelés nigericin jelenlétében szignifikánsan alacsonyabb pro-IL-1 β , hasított-kaspáz-1 és hasított IL-1 β pozitivitást eredményezett az egészséges donorok pDS-eihez képest. Így valószínűsíthető, hogy a betegek pDS-eiben a nagyfokú I-es típusú IFN útvonal aktivitás gátolja az IL-1 β útvonalat.

Az *NLRP3* inflammaszóma komponensek expresszióját a CD14⁺ monocita populációban is vizsgáltuk, mivel a monociták szintén fontos szerepet játszanak a psoriasis patomechanizmusában, ám IFN termelő képességük korlátozottabb, ezért tesztelni kívántuk, hogyan változik esetükben az *NLRP3* aktivitás. A legnagyobb eltérés a két sejt populáció között, hogy a betegek monocitáiban aktivációs szignál nélkül is magas a hasított kaspáz-1 szintje. Hasonló aktivációs szignálok (CpG-A, CpG-B, Imiquimod és nigericin) mellett a betegek monocitái esetében nem tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a hasított kaspáz-1, a pro-IL-1 β és a hasított IL-1 β fehérjék expressziós értékeiben, szemben a pDS populációval. Tehát a betegek monocitáit magasabb *NLRP3* aktivitás jellemezte.

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* inhibitor fehérjék expresszióját a humán pDS-ekben. A 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 nem indukálta ezeknek az *NLRP3* aktivációt gátló fehérjéknek az expresszióját. A psoriasisos betegekben PBMC-jében is szignifikánsan magasabb a *CH25H*, a *SOCS1* és a *COP1* mRNS szintű expressziója az egészséges donorokhoz képest. Így valószínűsíthető, hogy a magas I-es típusú IFN szint hatására indukálódó CH25H megakadályozhatja az IL-1 β transzkripcióját, a SOCS1 gátolhatja az *NLRP3* aktiválódását, a COP1 pedig korlátozhatja a kaspáz-1 aktiválódását a pDS-ekben. 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.

VI. MEGBESZÉLÉS

Az immunválasz során 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. Az általunk vizsgált RLR-ek olyan citoszólikus szenzorok, melyek a virális nukleinsavak felismerésére specializálódtak és a mitokondriális MAVS adaptor fehérjén keresztül az I-es típusú IFN-ok vagy egyéb pro-inflammatórikus citokinek termelődését indítják el. Habár az RLR jelátvitel esszenciális a vírusfertőzések megfékezéséhez, a túlzott immunválasz megelőzése érdekében ez a receptor útvonal is szigorú szabályozás alatt áll. A veleszületett immunitás RLR-közvetített jelátvitelét számos molekula szabályozza. 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 közvetlen kölcsönhatásba léphet a RIG-I közvetített antivirális jelátviteli útvonal fehérjéivel és így befolyásolják az adott szignalizációs út kimenetelét.

Az NLRX1 kezdetben az antivirális válaszok negatív szabályozójaként vált ismertté, mivel a mitokondrium külső membránján lokalizálódva kölcsönhatásba lép a MAVS-szal. Azóta számos tanulmány vizsgálta már az NLRX1 szerepét az antivirális jelátvitel során mind *in vitro*, mind *in vivo*, de ellentmondásos eredmények születtek. A tanulmányok ellentmondásai 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 pDS-ek funkcionális sajátosságai eltérnek mielőid „társaikétól”, így vizsgálataink során kontrollként moDS-eket is használtunk. 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 sejt típusokban, azonban a pDS-ek pro-inflammatórikus citokin szekréciójára nem volt hatással, míg a moDS-ekben fokozta azt. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy az NLRX1 túlnyomórészt az RLR jelátviteli útvonal negatív szabályozójaként működik a humán DS-ekben, azonban hatása sejtspecifikus.

Munkánk során az NLRX1 mellett vizsgáltuk az NLRC5 szerepét is az RLR útvonal szabályozásában. 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. Az NLRC5 szerepét pDS-ekben eddig még nem vizsgálták, ugyanakkor saját eredményeink alapján a pDS-ek RLR-indukált I-es típusú IFN

termelését negatívan szabályozza. A moDS-ek IFN produkcióját viszont nem befolyásolta az NLRC5 csendesítése. Továbbá az NLRC5 hiánya nem volt hatással az RLR-közvetített pro-inflammatorikus citokin válaszra egyik DS altípusban sem. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy az NLRC5 csak az RLR-közvetített I-es típusú IFN válaszokat szabályozza negatívan a humán pDS-ekben.

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 sejtfunciókban érvényesül leginkább, melyeket az adott sejt előtérbe helyez. Így a regulatórikus NLR-ek fő funkciója feltételezhetően negatív visszacsatolási mechanizmusok sejtípus-specifikus biztosítása, melyek főként azokat a sejtfunciókat szabályozzák, melyek túlzott aktivitása felboríthatja az immunhomeosztázist.

Munkánk során nemcsak a regulatórikus, hanem az inflammaszóma formáló NLR-eket is tanulmányoztuk, melyek az IL-1 β -közvetített immunválaszokért felelősek. Nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre arról, hogy az NLRP3 receptor és az aktivitásához köthető gyulladáshoz vezető citokin, az IL-1 β effektor funkciói milyen szerepet játszhatnak a pDS-mediált immunválaszokban.

Több tanulmány is arra utalt, hogy a pDS-ek alacsony antibakteriális aktivitással bírnak, a kettes típusú konvencionális DS-ekkel (cDS2) szemben, mivel az antibakteriális immunitásban résztvevő NLRP3 és a kaszpáz-1 alacsony expressziót mutatott ezekben a sejtekben. Egy másik, friss tanulmány szintén a cDS2-ket jelölte meg potens IL-1 β termelő sejteknek. Így ezek a tanulmányok a cDS2 altípushoz viszonyított igen alacsony pDS kaszpáz-1 expresszióra alapozva nem feltételezték, hogy a pDS-ek rendelkeznek inflammaszóma aktivitással. Azonban ezekben a tanulmányokban a cDS2-k kiemelkedően magas expressziós értékei mellett a pDS-ek értékei elmaszkírozódhattak. 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, amikben az NLRP3-függő IL-1 β útvonal is jelentős aktivitást mutat.

Így először megvizsgáltuk, hogy a humán pDS-ekben detektálható-e NLRP3 aktivitás. Protein szinten 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 vezető citokinek közül viszont csak az IL-1 β pro-formája volt detektálható protein szinten és csakis kizárólag aktivációt követően. Tehát a humán pDS-ekben főként az IL-1 β -nak lehet szerepe az NLRP3 által közvetített antimikrobiális immunválaszokban.

Érdekes módon az endoszómális TLR9 receptor két eltérő szerkezetű ligandjai közül csak a CpG-B bizonyult potens pro-IL-1 β induktornak, szemben a CpG-A-val. A különböző TLR aktivációs szignálok más-más pro-IL-1 β termelődési kinetikát is eredményeztek. Míg a TLR9 agonista, CpG-B 3-6 óra között indukált pro-IL-1 β termelődést, addig a TLR7 agonista, Imiquimod elnyújtott pro-IL-1 β termelődési kinetikát mutatott. Valószínű, hogy az Imiquimod ROS indukáló hatása szerepet játszhat az elnyújtott pro-IL-1 β termelődési kinetikában a pDS-ekben is. Megjegyzendő, hogy a makrofág altípusok is eltérő IL-1 β termelődési kinetikát mutatnak, így feltételezhető, hogy az aktivációs szignálok minősége nagy hatással van a sejtek IL-1 β kinetikájának profiljára.

Általában a kanonikus NLRP3 aktiválódáshoz két szignál szükséges. A priming szignál az NF- κ B útvonalon keresztül fokozza az NLRP3 és a pro-IL-1 β expressziót, valamint az NLRP3 poszttranszlációs módosításai révén előkészíti az inflammaszóma összeszerelődést, melyet majd egy másodlagos szignál indukál, mely lehet patogén, saját vagy idegen eredetű molekula is. Eredményeink alapján a pDS-ekben önmagukban a szintetikus TLR ligandokkal történő kezelés csak a priming lépésnek felel meg és nem indukál tényleges NLRP3 aktivációt. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy főként az az LPS endotoxin biztosít TLR4 aktiváción keresztül elég erős szignált a monocitákban ahhoz, hogy másodlagos aktiváció nélkül is aktiválódjon az inflammaszóma. A humán pDS-ekben a Gram negatív *E. coli* baktérium bizonyult a CpG-B-hez hasonlóan erős priming szignálnak, ugyanakkor önmagában nem indukált érett IL-1 β felszabadulást, mivel a humán pDS-ek szemben az egér pDS-ekkel nem expresszálnak TLR4-et.

Így megvizsgáltuk, hogy milyen másodlagos szignálok indukálhatják az NLRP3 összeszerelődését. Csak a kálium ionofórként működő bakteriális toxin, a nigericin indukált érett IL-1 β felszabadulást a sejtekben, mely már a primingot követő egy órás nigericin kezelés után is kimutatható volt. Ez arra utalhat, hogy pDS-ekben a kanonikus NLRP3 inflammaszóma aktiváció K⁺ effluxot igényel. Eredményeink alapján a makrofágokkal szemben a pDS-ek nem expresszálnak az ATP felismeréséhez szükséges P2X7 receptort, így az ATP nem működik esetükben NLRP3 aktivátorként, szemben a monocitákkal, makrofágokkal vagy moDS-ekkel.

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.

Eredményeink rávilágítottak arra is, hogy a nagymértékű I-es típusú IFN választ indukáló CpG-A, szemben a CpG-B-vel nem képes kiváltani IL-1 β termelődést a pDS-ekben. A CpG-A-

ban poli-G motívumok találhatóak, melyek nagymértékben segítik aggregációját és tetramer képzését. Így visszatartásra kerül a korai endoszómákban és nagy mennyiségű I-es típusú IFN szekréciónak vezet. A CpG-B nem képes tetramereket formálni, így hamar eljut a késői endoszómákba, ahol főként NF- κ B aktivációt indukál. 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 CpG-B vagy az *E. coli* sem voltak képesek nagyobb mértékű IL-1 β termelődést kiváltani, mely igazolta felvetésünket. Ez összhangban áll azzal, hogy a vírusfertőzések után gyakoriak a bakteriális felülfertőzések, melynek hátterében részben a vírusok által aktivált IFN útvonal antibakteriális IL-1 β útvonalra gyakorolt gátló hatása állhat. Azonban az IL-1 β például a PGE2 termelődés fokozása révén szintén képes gátolni az I-es típusú IFN-ok szekréciónak. Tehát az IL-1 β útvonal aktivációja is gátlólag hathat az I-es típusú IFN útvonalra, melyet mi is tapasztaltunk kísérleteink során, mivel az IL-1 β jelenléte gátolta a CpG-A indukált IFN- α termelést a pDS-ekben.

Az I-es típusú IFN és IL-1 β útvonalak közötti interakciók a különböző autoimmun kórképek patomechanizmusának szabályozásában is fontos szerepet játszanak. Továbbá az I-es típusú IFN-ok gátló hatása fontos terápiás megoldás is lehet, például olyan SM betegek esetében, akiknél fokozott NLRP3 aktivitás detektálható. Fontos kiemelni, hogy mind a pDS-ek, mind az NLRP3 receptorok túlműködése szerepet játszik különböző autoimmun betegségek patomechanizmusában. Az NLRP3 SNP-ek, melyek főként funkcionyerő mutációk, már leírták például SLE-ben, IBD-ben, SM-ben, RA-ban, valamint psoriasis esetében is. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a pDS-ek is szerepet játszhatnak a psoriasis patogenezisében, ugyanis a sejtpusztulás következtében felszabaduló saját nukleinsavak a túltermelt LL37 antimikrobiális peptidekkel komplexben a pDS-ek túlzott aktivitását és fokozott I-es típusú IFN termelését indukálják, ami elősegíti az autoimmun folyamatok kialakulását. 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.

Külön vizsgálva a betegek CD14⁺ monocita populációját azonban alapszinten magasabb inflammaszóma aktivitást figyeltünk meg, szemben a pDS-ekkel. 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, illetve a precízebb összehasonlítás érdekében a pDS-ekre szabott aktivációs szignálokat használtunk a monociták esetében is, és nem az ezeken a receptorokon keresztüli aktiváció jelenti a legerősebb stimulációt számukra.

Végül kíváncsiak voltunk mi állhat az IFN-ok gátló hatásának hátterében a pDS-ek esetében. Más sejtekben az I-es típusú IFN-ok számos negatív NLRP3 regulátor fehérjének az expresszióját képesek fokozni. 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 e transzkriptumok expressziója. 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.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy az NLRP3 útvonal funkcionálhat a humán pDS-ekben is. Ugyanakkor igazoltuk, hogy a pDS-ek NLRP3 aktivitása alacsonyabb, mint egyéb mieloid sejteké, mely valószínűleg az alacsony kaspáz-1 expressziójuknak és a magas I-es típusú IFN útvonal aktivitásuknak köszönhető. Ugyanis nagymértékű I-es típusú IFN választ kiváltó stimulusok hatása fokozódik az NLRP3 útvonal 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 kifejeződnek a regulatórikus és az inflammaszóma formáló NLR-ek. Továbbá sikerült feltárnunk a regulatórikus NLR és RLR receptorok közötti, illetve az I-es típusú IFN és NLRP3-függő IL-1 β útvonalak közötti negatív interakciókat. Egyre több bizonyíték utal arra, hogy az abnormális RLR aktiváció miatt kialakuló kóros I-es típusú IFN termelés szerepet játszhat az autoimmun betegségek patogenezisében. Az IFN-ok mellett az NLRP3 inflammaszóma túlműködésével asszociált fokozott IL-1 β produkció is hozzájárul a tolerancia áttöréséhez és az autoimmun betegségek kialakulásához. Ezért a veleszületett immunitás negatív szabályozásának hátterében 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 „fékjeiként” 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. 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 útvonalait 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 útvonal csak olyan gyulladáshoz vezető körülmények között lehet aktív a pDS-ekben, melyekben az I-es típusú IFN útvonal aktivitás nem dominál, mivel a magas I-es típusú IFN szinttel járó állapotok számos NLRP3 gátló fehérjének az expresszióját fokozzák. Munkánk során tehát sikerült új receptor interakciókat, illetve inflammaszóma aktivitást feltárni egy olyan sejt típusban, melynek szerepe számos patológiás állapotban ismert. A pDS-ek és az NLR-ek nem megfelelő működése is lényeges kóros 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.

VIII. 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

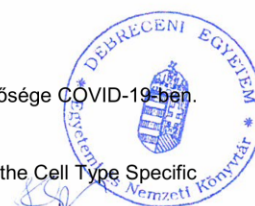
Jelölt: Bencze Dóra
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10068399

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.

IX. KULCSSZAVAK

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

X. 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 tanácsaiból és gyakorlatias meglátásaiból 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-21-3-II-21 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság program finanszírozásában valósult meg.