

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Dendritikus sejtek immunmoduláló funkcióinak szabályozása  
endogén és exogén módokon**

Ágics Beatrix

Témavezető: Dr. Pázmándi Kitti Linda



DEBRECENI EGYETEM  
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2025

**Dendritikus sejtek immunmoduláló funkcióinak szabályozása endogén és exogén módokon**

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

Írta: Ágics Beatrix, okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Pázmándi Kitti Linda, PhD

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Gácsér Attila, MTA doktora  
Dr. Szatmári István, PhD

A bírálóbizottság elnöke: Prof. Dr. Balogh István, MTA doktora

A bírálóbizottság tagjai: Dr. Kapitány Anikó, PhD  
Dr. Szabó Zsófia, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme  
2025. július 08. 13:00 óra

## I. Bevezetés

A veleszületett immunrendszer sejtjeiként a dendritikus sejteknek (DS) kiemelkedő szerepe van a szervezetbe kerülő patogének és saját veszély szignálok felismerésében, a gyulladási folyamatok elindításában és az antigének T-sejtek felé történő prezentálásában. Egyedülálló immunmoduláló képességük révén döntően befolyásolják a T-sejt polarizáció irányát is, így a humán DS-ek sokoldalú terápiás célpontok lehetnek. Funkcionális aktivitásukat számos endogén szabályozó mechanizmus felügyeli és irányítja, valamint exogén stimulációs jelekkel is nagymértékben befolyásolhatóak a DS funkciók. Munkánk során célul tűztük ki, hogy különböző endogén és exogén behatások révén megpróbáljuk befolyásolni a DS-ek immunmoduláló képességét. Elsőként a DS-ek egyik belső, központi szabályozó rendszerének, azaz a rapamycin emlős célpontnak (mTOR) a szabályozó szerepét vizsgáltuk meg a citoszólban szaporodó vírusok felismerésére specializálódott retinsav-indukálható gén- (RIG) I-szerű receptorok (RLR) által közvetített DS funkciókban. Munkánk során mTOR inhibitorok segítségével feltártuk, hogy az mTOR jelátvitelnek fontos szerepe van a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS) és plazmacitoid DS-ek (pDS) RLR-mediált antivirális és gyulladási citokin válaszaiban és T-sejt aktiváló képességében. További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az exogén stimulációs szignálok módosításával hogyan befolyásolható a DS-ek immunmoduláló hatásai. Így sugárzással méregtelenített lipopoliszacharid (RD-LPS) moDS-ekre gyakorolt hatását hasonlítottuk össze natív LPS-sel (N-LPS). Megvizsgáltuk továbbá az RD-LPS hatását a parlagfű által kiváltott allergiás légúti gyulladásokban is, és megállapítottuk, hogy a beltéri környezet méregtelenített LPS-sel történő renaturálásával megelőzhető lehet a Th2 mediált allergiás gyulladások kialakulása, mivel az RD-LPS-sel a DS-ek Th1 polarizáló képessége fokozható, ami háttérbe szorítja a Th2 válaszokat. Munkánk során tehát új, endogén és exogén szignálok révén megvalósuló immunmodulációs lehetőségeket tártunk fel, mellyel befolyásolható a DS-ek funkcionális aktivitása és ezáltal a szervezetben zajló különböző gyulladási folyamatok kimenetele.

## II. Irodalmi áttekintés

### II.1 A DS-ek jelentősége, eredete és altípusai

A természetes immunrendszer szervezetünk első védelmi vonala, melynek elemei között találjuk a DS-eket, melyek azonnal felismerik a veszély szignálokat vagy a szervezetbe került idegen struktúrákat és azonnali immunreakciókat indítanak el.

A DS-ek professzionális antigén prezentáló sejtekként (APS) nagy jelentőséggel bírnak a veleszületett és az adaptív immunrendszer közötti kapcsolat kiépítésében is mivel meghatározó szerepük van az antigének érzékelésében, felvételében, feldolgozásában, a T-sejtek felé történő bemutatásában és ezáltal az adaptív immunitás aktiválásában. A naív T-sejt aktiválás mellett részt vesznek a memória T-sejtek létrehozásában, továbbá képesek segíteni a B-sejt aktivációt, így az adaptív immunválasz indukálása mellett az immunológiai memória kialakításában is szerepet vállalnak. Továbbá fiziológiás körülmények mellett a DS-ek hozzájárulnak a stabil immunhomeosztázis és a saját szövetek elleni immunológiai tolerancia fenntartásához is.

A DS-ek, a mezenchimális eredetű folliculáris DS-ek kivételével a CD34<sup>+</sup> hemopoetikus csontvelői őssejtekből (HSC) mieloid és limfoid fejlődési útvonalon egyaránt kialakulhatnak a granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (GM-CSF), illetve a citokin Fms-szerű tirozin kináz-3-Ligand (Flt3L) differenciálódást segítő mediátorok hatására. A mieloid fejlődési út során a mieloid progenitor sejtől a magas interferon regulatórikus faktor 8 (IRF8) expressziót mutató granulocita-monocita közös prekursorokból (GMDP) keletkeznek a csontvelőben a pre-konvencionális vagy klasszikus DS-ek (cDS), a plazmacitoid DS-ek (pDS) és a tranzicionális DS-ek (tDS), melyek valószínűleg a pDS-ek egyik alpopulációját képezhetik, viszont pontos eredetük még tisztázásra szorul. A pre-cDS-ek transzkriptomikai szinten heterogének és előzetesen elkötelezettek a cDS1 vagy a cDS2 fejlődés 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 monocita-eredetű DS-ekké (moDS). A monocita-DS prekursorokból (MDP) kétféle DS keletkezhet; egyrészt a cDS3, másrészt gyulladáshoz vezető stimulus hatására moDS. A limfoid fejlődés során szintén

kialakulhatnak DS-ek a limfoid progenitorokból (LP), úgymint a pre-pDS-ek és a belőlük kialakuló pDS-ek, illetve cDS1-ek is differenciálódhatnak a limfoid vonalon.

## II.2 A vérben lévő DS altípusok specializált funkciói

A vérben keringő DS-ek a mononukleáris sejtek mindössze 0,1-1 %-át teszik ki és a különböző DS alpopulációk meghatározott, specializált immunológiai funkcióval bírnak. A cDS1-eknek az intracelluláris patogének és a tumorok elleni immunválaszban van fontos szerepe. A cDS2-k az immunválaszokat több irányba is polarizálhatják. A szöveti mikrokörnyezet és az antigén fajtájától függően képesek indukálni a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtek Th1, Th2 vagy Th17 sejtekké történő polarizálódását is, de magas IL-23 szekréciójuknak köszönhetően a Th17 válaszok elindításában van kiemelkedő szerepük. A DS3 alcsoportot vegyes monocita-cDS2 fenotípus és transzkripciós profil jellemzi. A cDS2-khöz hasonlóan képesek IL-12 és IL-23 termelésre, valamint a monocitákhoz hasonlóan nagy mennyiségű IL-1 $\beta$  szekréció jellemzi ezen DS altípust. Hatékonyan stimulálják a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejteket, főként Th1 és Th17 polarizációt indukálnak, továbbá a naiv CD8<sup>+</sup> T-sejtek proliferációját stimulálják és segíthetik a szövetrezidens memória T-sejtek kialakulását is.

Gyulladás során humán monocitákból monocita-eredetű DS-ek (moDS) differenciálódnak, melyek a cDS2-khöz hasonlóan IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 és IL-23 citokineket szekretálnak főként, valamint szintén hatékonyan indukálhatják a naiv CD4<sup>+</sup> T-sejtek proliferációját és kontextustól függően a Th1, a Th17, a CD8<sup>+</sup> T-sejtek és a Tfh sejtek differenciálódását. *In vitro* körülmények között CD14<sup>+</sup> monocitákból különböző citokinek, úgymint GM-CSF és IL-4 jelenlétében is differenciálódnak moDS-ek, melyekkel kiválóan modellezhetőek az éretlen és érett DS-ek fenotípusos és funkcionális sajátosságai.

A DS alcsoportok közül a pDS-ek szerepe az antivirális immunitásban kulcsfontosságú. Ugyanis professzionális I-es típusú interferon (IFN) termelő sejtekként egyedülálló tulajdonságuk, hogy virális stimulusra nagy mennyiségben és nagyon gyorsan képesek termelni I-es típusú IFN-okat, főként IFN- $\alpha$ -t. Az I-es típusú IFN-ok autokrin és parakrin módon hatva olyan folyamatokat indítanak el, melyek megakadályozzák a vírusok terjedését és elősegítik a vírusok, valamint a vírussal fertőzött sejtek eliminációját. Vírusfertőzést követően a mononukleáris sejtek által termelt I-es típusú IFN-ok 95%-a a pDS-ekből származik, mivel 200–1000-szer több I-

es típusú IFN-t képesek termelni, mint bármelyik másik fehérvérsejt vírus expozíció hatására.

A vérben lévő DS altípusok többsége fiziológiás körülmények között is folyamatosan kivándorol a perifériás szövetekbe, ahol további differenciálódáson mennek keresztül és az agy kivételével az összes szövetben kimutathatók. A perifériás szövetekben nem osztódnak, hanem folyamatosan pótlódnak, mert viszonylag rövid *in vivo* élettartamukkal rendelkeznek (kb. 3-5 nap). A perifériás szövetekben és a nyirokcsomókban található DS-ek prekursorai valószínűleg tehát a vérben található DS alpopulációk, melyek között szöveti lokalizációjuk alapján megkülönböztethetünk migrációs és szövet rezidens DS-eket is. A nyirokcsomókban előforduló DS-ek mintegy fele rezidens DS, a másik fele az érett fenotípust mutató, a nyirokerekben keresztül érkező DS-ek, amik a periférián felvett antigéneket szállítják be a nyirokcsomókba, ahol az antigének bemutatása zajlik a T-sejtek felé.

### **II.3 A DS-ek mintázatfelismerő receptorai (PRR)**

A veleszületett immunrendszerhez tartozó sejtek PRR-ekkel képesek detektálni a mikroorganizmusokból származó patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP), vagy az endogén eredetű sérülés-asszociált molekuláris mintázatokat (DAMP), amik lehetnek idegen vagy saját eredetűek és főként szövetsérülések nyomán szabadulnak fel.

A mikrobiális struktúrák felismerésében kiemelkedő szerepe van a transzmembrán Toll-szerű receptoroknak (TLR), melyeknek emlősökben 13 fajtáját, emberben pedig 10 különböző fajtáját azonosították eddig. A TLR-ek egy része a sejtfelszínen, a plazmamembránban lokalizálódik (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) és főleg a mikrobiális sejtfal komponenseket ismeri fel. A TLR-ek másik része (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) az endoszómákban lokalizálódik és főként mikrobiális vagy saját eredetű nukleinsavak felismerésére specializálódtak. A felismerést követően a TLR-eken keresztüli jelátviteli útvonalak aktiválják az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktort, ami IL-6, IL-12 és TNF- $\alpha$  pro-inflammatórikus citokinek termelődéséhez vezethet. Az IRF3 és IRF7 aktiváció révén pedig főleg I-es típusú IFN-ok (INF $\alpha$ , INF $\beta$ ) termelődését indukálja.

Számos patogén fertőzés során a kórokozók bejuthatnak a gazdasejt citoplazmájába és ott replikálódhatnak. Emellett a DS-ek sokféle citoplazmatikus

receptort is expresszálnak, melyek főként a patogének nukleinsavainak felismerésére specializálódtak. Ilyenek a citoplazmatikus retinsav-indukálható gén (RIG)-I-szerű receptorok (RLR), a melanómában hiányzó fehérje 2 (AIM2) -szerű receptorok (ALR), továbbá az interferon gén stimulátor (STING) aktiváló ciklikus GMP-AMP szintáz (cGAS) receptorok, és az IFN-regulatórikus faktor DNS dependens aktivátora (DAI), illetve a 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. A mitokondriális antivirális szignalizációs fehérjét (MAVS) és a STING adapter proteint használó citoszólikus PRR-ek főként az IRF3-at és az IRF7-et aktiválják az NF- $\kappa$ B transzkripció faktoron kívül, és az I-es típusú IFN-ok, illetve a pro-inflammatórikus citokinek termelését váltják ki. A nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű citoszólikus receptorok (NLR-ek) egyes típusai is képesek lehetnek a citoszólikus nukleinsavak felismerésére, azonban ezen receptorok emellett inflammaszómákat, szignaloszómákat, enhanszoszómákat, illetve autofagoszómákat is képeznek, mely révén segítik az intracelluláris patogének eltávolítását.

A citoszólikus nukleinsav szenzorok közül munkacsoportunk elsősorban az RLR-ek funkcióinak tanulmányozásával foglalkozik. Korábban munkacsoportunk publikálta, hogy a vérben keringő cDS-ekhez hasonlóan a moDS-ek is konstitutívan expresszálnak az RLR-eket, szemben a pDS-ekkel, amikben az RLR-ek két fajtája, a RIG-I és az melanoma differenciálódáshoz kapcsolódó fehérje 5 (MDA5) nem, vagy csak nagyon alacsony szinten expresszálnak. Ugyanakkor a pDS-ekben konstitutívan kifejeződő endoszomális TLR-eken (TLR7, TLR9) keresztüli stimuláció mellett, hogy nagy mennyiségű I-es típusú IFN termelést eredményez, nagymértékben képes indukálni az RLR-ek kifejeződését is az autokrin I-es típusú IFN hatásoktól függetlenül. Ezen megfigyelések azt mutatják, hogy bár az RLR-ek hiányoznak a nyugvó pDS-ekből, vírusfertőzések esetén indukálhatóak, így hozzájárulhatnak a pDS-ek I-es típusú IFN-válaszainak késői fázisaihoz.

## **II.4 A DS funkciók szabályozása endogén módon**

### ***II.4.1 Az mTOR jelátviteli út vonal jelentősége a DS-ekben***

Korábban széles körben tanulmányozták az mTOR szerepét a DS-ek biológiájában és megállapították, hogy az mTOR fontos szerepet játszik a veleszületett

immunsejtek funkcióinak szabályozásában, így köztük a DS-ek fejlődésének, differenciálódásának és működésének koordinálásában.

Az mTOR a sejtekben két különböző multiprotein komplexben, az mTORC1-ben és mTORC2-ben fordul elő. Az mTOR nevét a *Streptomyces hygroscopicus* baktérium fajból izolált gátlószeréről, az eredetileg gombaellenes, majd később immunszuppresszív hatóanyagként jellemzett rapamycinről kapta. A rapamycin az mTOR erős allosztérikus inhibitoraként gátolja az mTORC1 downstream jelátvitelt, miközben nem befolyásolja az mTORC2 aktivitását. Az új ATP-kompetitív katalitikus inhibitorok például AZD8055, ADZ2014, Torin-1 és PP242 az ATP kötő helyet célozzák meg az mTOR doménben, így képesek gátolni mindkét mTOR komplex aktivitását. Az mTORC1 és mTORC2 komplexek mind szerkezetükben, mind funkcióikban eltérőek.

A DS-ekben az mTORC1 reagál a különböző extracelluláris tétől származó jelekre, úgymint például a növekedési faktorokra, citokinekre vagy a PPR-ek által érzékelt szignálokra, de érzékeli az intracelluláris jeleket is, beleértve a DAMP-okat, tápanyagok szintjét és a sejtek energiatöltését. Az mTORC1 két legfontosabb célmolekulája, az S6K és a 4E-BP1. Az mTORC1 foszforilálja az S6K1-et, ami további foszforilációs események után éri el teljes aktivitását és foszforilálja a downstream célpontjait: a 40S-et és az S6-ot, ezzel elősegítve a riboszomális biogenezist, mely protein szintézist eredményez és fokozza a sejtproliferációt. Az mTORC1 az S6K-n keresztül az mTORC2 aktivitását is befolyásolja, ugyanis az S6K közvetlenül foszforilálja a Rictort, és így az mTORC2 funkcióit gátolja. Továbbá az mTORC1 foszforilálja a 4E-BP1-et, az leválik a transláció iniciációs faktorról és a gátlás alól felszabadult eukarióta translációs iniciációs faktor 4E (eIF4E) elindítja a cap-függő translációkat. Jól ismert az mTORC1 autofágiát gátló hatása is, amennyiben rendelkezésre állnak a megfelelő feltételek úgymint például tápanyag és energia. Az mTORC2 upstream szabályozói hasonlóan az mTORC1-hez növekedési faktorok. Az mTORC2 közvetlenül foszforilálja az Akt-ot és aktivitása főként a sejt alakjának változásaiban nyilvánul meg, mivel fontos szerepet játszik az aktin citoskeleton szerkezetének módosításában.

Számos vizsgálatban kimutatták, hogy az mTOR részt vesz a DS-ek immunmoduláló funkcióinak szabályozásában és képes befolyásolni a DS-ek effektor T-

sejt aktiváló képességét. Továbbá feltárták az mTOR szerepét az endogén és az exogén antigének bemutatásában és a TLR-ek által közvetített immunológiai funkciók szabályozásában is. A különböző TLR ligandumok, mint például polyI:C és az LPS hatékonyan indukálják a DS-ekben az mTORC1 célmolekulájának az S6K-nak a foszforilációját is, melyet a rapamycin gátol. Elsőként részletesebben a pDS-ekben írták le, hogy a TLR-ek által közvetített I-es típusú IFN-ok indukciójához a PI3K-mTOR-S6K útvonal kulcsfontosságú. Későbbi vizsgálatok megerősítették, hogy az mTOR elengedhetetlen a humán moDS-ek és a vérben keringő CD1c+ cDS-ek polyI:C indukált endoszomális TLR3 által közvetített I-es és III-as típusú IFN-ok szekréciójához. Számos tanulmány foglalkozott az mTOR útvonal szerepével a gyulladásos citokinek termelésének szabályozásában az extracelluláris patogének elleni immunválasz esetében is. Az mTOR-t az NF- $\kappa$ B jelátviteli útvonal kulcsfontosságú negatív és a transzkripció jelátalakító és aktiváló 3 (STAT3) jelátviteli útvonal pozitív szabályozójaként azonosították. Továbbá több irodalmi adat alátámasztja, hogy az mTOR a TLR4 liganddal stimulált mieloid DS-ekben és moDS-ekben eltérően szabályozza a citokin termelést, és jelzi, hogy az NF- $\kappa$ B és a STAT3 indukciója az mTOR útvonal szabályozása alatt áll a DS-ekben. Az LPS-sel stimulált, különböző DS altípusokban az mTOR szintén eltérően szabályozza a sejtfelszíni molekulák expresszióját is, mely befolyásolja a sejtek fenotípusos érését és ezáltal a DS-ek T-sejtekkel történő interakcióit is, azaz az antigén prezentációt is. Például irodalmi adatok alapján ismert, hogy az mTOR negatívan szabályozza a humán mieloid DS-ek T-sejt-proliferációt indukáló képességét, míg moDS-ek esetében elengedhetetlen a hatékony T-sejt proliferáció kiváltásához.

A különböző DS altípusok aktivációt követően eltérő metabolikus átprogramozáson esnek át. Így elképzelhető, hogy a különböző DS altípusok eltérő metabolikus igénye az mTOR eltérő szabályozó funkcióját eredményezi, így az egyes DS altípusokban az mTOR inhibitorok különbözőképpen befolyásolhatják a DS-ek citokin termelését és fenotípusos érését. Az irodalmi adatok jól tükrözik, hogy a TLR aktiváció mTOR függését már átfogóan tanulmányozták a különböző DS altípusokban, ugyanakkor az RLR-függő DS funkciók esetében az mTOR szabályozó szerepe még kevésbé ismert.

## **II.5 A DS funkciók szabályozása exogén módon**

### ***II.5.1 A környezeti mikrobák szerepe az immunstátusz kialakításában: higiénia hipotézis és farm hatás***

Napjainkban széles körben elfogadott, hogy a környezetben, a bőrön, a bélben vagy a tüdőben található jótékony mikrobákkal való szimbiotikus kapcsolat felelős az egészséges immunhomeosztázisért, ami megfelelő immunszabályozáshoz vezet és például az allergiás betegségek alacsony előfordulását eredményezi.

Számos tanulmány foglalkozik azzal, hogy a fertőzések bizonyos esetekben kedvező hatást gyakorolhatnak az allergiás vagy autoimmun betegségekre. Először több, mint 30 éve Strachan vetette fel, hogy a fertőzések és a nem higiénikus érintkezések védelmet nyújthatnak az allergiás megbetegedések kialakulásával szemben. Azóta számos publikáció foglalkozott az úgynevezett higiénia hipotézissel az epidemiológia, az immunológia és a klinikai tudományok területein egyaránt. Az allergiás betegségek növekedésében a beltéri és kültéri levegőszennyezésen túl valószínűleg szerepet játszik az is, hogy a nyugati életmód miatt a jólét növekedésével párhuzamosan csökken a fertőzéseknek való kitettség is. A higiénia hipotézist alátámasztják olyan korábbi és újabb epidemiológiai megfigyelések is, amelyek arról számoltak be, hogy a hagyományos farmon felnövő gyermekeknél, akiket sokféle környezeti mikrobiális hatás ér, csökken az atópiás rendellenességek előfordulása. Bár ennek a megfigyelt hatásnak a pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, feltehetően a gazdálkodási környezetben a magas környezeti endotoxinok való folyamatos kitettségnek tulajdonítható, ami befolyásolja a veleszületett immunitás szabályozását és elősegíti a Th1 és szabályozó T-sejtek indukcióját. A potenciálisan védelmet biztosító környezeti faktorok közül elsősorban a Gram negatív baktériumokból származó endotoxint emelik ki.

Fontos kiemelni, hogy a farm expozíció védő hatásai legerősebbek a prenatális időszakban és a korai gyermekkorban. A legtöbb ezzel kapcsolatos tanulmányban a születés utáni időablak egerek esetében az élet első 3 hetére, míg emberek esetében az első életévre vonatkozik. A farmi környezet védőhatása például az allergiás nátha kapcsán iskolás korig érvényesül, és felnőttkorig is tartós hatást fejt ki, különösen folyamatos expozíció esetén. Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a hipotézissel, hogy az allergia megelőzésének lehetősége a gyermekkorban rejlik, továbbá

felmerülhet a kérdés, hogy szükséges-e további expozíció a gyermekkoron túl a védő hatás fennmaradásához.

Egérmodellekkel végzett *in vivo* vizsgálatok megállapították, hogy a belélegzett endotoxin a védő hatását valószínűleg a légúti nyálkahártyán fejt ki. Kimutatták, hogy az alacsony dóziszú endotoxin vagy mezőgazdasági por expozíció megvédi az egereket a háziporatka által kiváltott asztma kialakulásától, mivel csökkentette a hámsejtek citokin termelését, ami csökkent DS aktivációt és II-es típusú allergiás gyulladást eredményezett. Továbbá az újszülött egerekben az LPS stimuláció asztma-megelőző hatással bírt, ami csökkent nyálkahártya metapláziával és mucin termeléssel jár asszociált ovalbuminnal történő allergizációt követően. Ezen kísérletben normál thymus stroma limfopoetin (TSLP) és IL-4 szintek mellett megnövekedett IL-12, TNF- $\alpha$  expressziót tapasztaltak. Továbbá az állatkísérletek azt is igazolják, hogy az endotoxinnal történő beavatkozások akkor lehetnek a leghatékonyabbak és legbiztonságosabbak, ha azokat az allergén szenzitizáció és az atópiás gyulladás kialakulása előtt kezdik meg. Az időzítés, az endotoxin dózisa és egyéb környezeti faktorok mellett a gazdaszervezet-mikrobiom kölcsönhatása is meghatározó az expozíciókra adott immunválaszok kialakításában.

Ezek a megfigyelések együttesen felvetik annak a lehetőségét, hogy a csecsemők belső városi környezetének renaturálása valószínűsíthető megoldásnak tűnik az allergiás betegségek kialakulásának megelőzésére. A farmhatás utánzása a városi környezet endotoxin szintjének helyreállításán keresztül azonban csak tolerálható dózis és az endotoxinok nem toxikus, biztonságos formájának alkalmazásával lehetséges. Az LPS intravénás beadása ugyanis súlyos toxicitást vált ki emlősökben, maximális tolerálható dózisa emberekben csak 1-4 ng/testtömeg-kg. Ugyanakkor az LPS toxicitása orális módon történő adagolás esetén meglehetősen alacsony. Például patkánykísérletben kimutatták, hogy nagy dóziszú (2 mg/kg) LPS orális adagolása nem volt toxikus az állatokra. Így az LPS orális adagolása tűnik a legmegfelelőbb bejuttatási módnak különböző betegségek, köztük allergiás és életmóddal kapcsolatos betegségek ellen.

### ***II.5.2 Az LPS toxicitásának befolyásolása***

A külső membránban található LPS vagy endotoxin a baktériumok egyik fő immunstimuláló része, ami mindenütt jelen van a környezetben és közvetlenül befolyásolhatja az immunválaszok kimenetelét, így nagy jelentősége van számos betegség patofiziológiájában is. Az LPS három különálló régiót tartalmaz: az O-

poliszacharid régiót az LPS molekula legkülső részén, az R-mag poliszacharidokat és a molekula endotoxikusan aktív részét a lipid-A-t. Az *O*-poliszacharid régió az LPS-molekula legkülső része a fő antigén, amelyet a gazdaszervezet antitest válasza megcéloznak. Viszont az LPS erőteljes immunstimuláló képessége nagyrészt az endotoxin lipid-A részének tulajdonítható.

Eddig számos kísérlet történt fizikai, kémiai vagy bioszintetikus mérnöki megközelítésekkel az LPS endotoxikus aktivitásának csökkentésére, illetve a toxikus és immunstimuláló aktivitás elkülönítésére. Ilyen például a kálium-metiláttal méregtelenített készítmény az ún. monofoszforil lipid-A (MPLA), melyet az 1980-as években állítottak elő. A difoszforil-lipid-A (DPL) a *Salmonella minnesota* R595 törzs LPS-ének méregtelenített változata, ami képes stimulálni az immunrendszert anélkül, hogy közvetlen toxikus hatást váltana ki. Az LPS toxicitását bioszintetikus eljárásokkal is befolyásolhatják. Az LPS bioszintézisében résztvevő gének gátlásával vagy módosító enzimek indukálásával úgy csökkenthetik az LPS toxicitását, hogy közben az megtartja adjuváns aktivitását, ami biztonságosabb élő, legyengített vakcinák vagy külső membrán vezikula (OMV) vakcinák előállítását is lehetővé teszi.

Az endotoxinok méregtelenítésének további hatékony formája az ionizáló  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -sugárzással történő kezelés, ami leépíti az LPS szerkezetét és biológiai funkcióinak elvesztéséhez vezet. A növekvő dózisu sugárzás hatására az endotoxin trilamináris, szalagszerű szerkezete göcös szerkezetet mutat és a morfológiai változásokkal párhuzamosan az *O*-oldallánc ismétlődő egységei és az R-mag liposzacharid molekuláinak egyes darabjai elvesznek. A sugárzás lebontja az egyszerű cukrokat a szerkezeten belül, úgymint a galaktózt, galaktózamint, glükózamint, glükózt és heptózt. Ezáltal csökkenti a poliszacharid rész antigenitását. Az R-mag komponense, a Kdo a leginkább ellenálló cukorszarmazék az ionizáló sugárzással szemben. Az endotoxin hidrofób lipid-A része még viszonylag nagy sugárzás mellett is kevésbé degradálódik, mint a cukor komponensei. A lipid-A zsírsavai közül azonban vagy a  $\beta$ -hidroximirisztinsav mirisztinsavvá történő részleges átalakulását vagy szelektív elvesztését figyelték meg a sugárzás hatására. Továbbá a besugárzott lipid-A-ban csökkent a glükózamin és a foszfát mennyisége is. Bertók Lórándnak és munkatársainak sikerült olyan 150 kGy erősségű  $^{60}\text{Co}$  sugárzással méregtelenített LPS készítményt (RD-LPS, TOLERIN<sup>®</sup>) előállítani, ami csökkent toxicitást mutatott,

miközben megőrizte jótékony immunmoduláló hatását. Széleskörű állatkísérletek és embereken végzett vizsgálatok alapján ezen méregtelenített endotoxin készítmények alkalmasak a természetes ellenállóképesség fokozására, különféle sokkos állapotok (sugárbetegség, szепtikus-sebészeti sokk stb.) kivédésére, továbbá különböző eredetű immunszuppressziós vagy immunhiányos állapotok javítására, valamint adjuváns hatásuk miatt, elölt vírusokból készült oltóanyagok hatásfokának, immunogenitásának javítására. Vannak biztató eredmények a TOLERIN®-nel kapcsolatban a szerzett immunhiányos betegség (AIDS), illetve az azt megelőző állapot, valamint a daganatellenes szerekkel kezelt betegek csontvelő működésének helyreállítása esetében is.

### III. Célkitűzések

1. Munkánk során első célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy az endogén szabályozó folyamatok, úgymint az mTOR által történő szabályozás hogyan hat a DS-ek RLR-mediált immunológiai funkcióira.

Így elsőként megvizsgáltuk, hogy:

- az RLR aktiváció mTOR függő-e,
- az mTOR gátlása hogyan befolyásolja a moDS-ek és a pDS-ek RLR aktiváció indukált fenotípusos és funkcionális érését,
- az mTOR gátlása hogyan hat az RLR-aktivált moDS-ek és pDS-ek naiv T-sejt aktiváló képességére?

2. Mivel a DS funkciókat a környezetből származó, exogén faktorok is befolyásolják, munkánk másik célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a TLR által közvetített exogén stimulációs jelek módosítása milyen hatással van a humán DS-ek immunmodulációjára. Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- hogyan változik a sugárzással méregtelenített LPS (RD-LPS) toxicitása a natív LPS-hez (N-LPS) képest,
- hogyan befolyásolja a TLR által közvetített RD-LPS expozíció a DS-ek funkcióit,
- hogyan hat az RD-LPS aktiváció a moDS-ek T-sejt polarizáló képességére?
- képes-e megelőzni az RD-LPS-sel történő előzetes expozíció a parlagfű okozta Th2 mediált légúti gyulladás kialakulását *in vivo* egérmodellben?

## **IV. Anyagok és módszerek**

### **IV.1 A kísérletek során használt sejtvonal és primer humán sejtek**

Kísérleteink során egy humán pDS sejtvonalat, a GEN2.2-t használtuk, melyet Dr. Joel Plumas és Dr. Laurence Chaperot (Research and Development Laboratory, French Blood Bank Rhône-Alpes, Grenoble, Franciaország, CNCMI szám: 2938) biztosított számunkra.

Buffy coat mintákból primer humán perifériális vér mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk Ficoll-Paque Plus gradiens centrifugálással. A primer humán CD14<sup>+</sup> monocitákat PBMC-ből pozitív szelekcióval nyertük ki, mágneses sejt elválasztási módszerrel anti-CD14-hez konjugált mikrogöngyöket használva. A frissen izolált sejteket GM-CSF és IL-4 jelenlétében DS-ekké differenciáltattuk.

A primer humán pDS-eket szintén PBMC-ből izoláltuk pozitív szelekcióval a humán CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit segítségével.

Az autológ és allogén primer naiv CD8<sup>+</sup> T-sejteket a humán naiv CD8<sup>+</sup> T-sejt izoláló kittel nyertük ki a PBMC-ből, és a DS-T-sejt ko-kultúra kísérletekhez használtuk.

Az egészséges véradóktól származó heparinizált vérminták gyűjtési protokollja megfelelt a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek, és az Országos Vérellátó Szolgálat, valamint a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Regionális és Intézeti Etikai Bizottsága is jóváhagyta (OVSzK 3572-2/2015/5200, Magyarország).

### **IV.2 Bakteriális endotoxin készítmények előállítása**

Az *in vitro*, illetve *in vivo* kísérletekhez használt LPS-t *Escherichia coli* O101RG/W szerotípusú törzsből extraháltuk forró vizes fenol módszerrel. A sugárzással méregtelenített LPS-t (RD-LPS; tételszám: 92040605/K/01; Országos Sugárbiológiai és Sugárhigiéniai Kutatóintézet, Budapest, Magyarország) az LPS natív formájából (N-LPS) állították elő 150 kGy erősségű <sup>60</sup>Co ionizáló sugárzással. Az N-LPS és az RD-LPS toxicitását BALB/c egereken teszteltük. Az LPS-kivonatok β-hidroximirisztinsav tartalmának elválasztását és tömegspektrometriás detektálását Infinity 1290 UHPLC-vel kapcsolt 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS rendszerrel végeztük.

### **IV.3 A DS-ek fenotípusos és életképesség vizsgálata áramlási citometriával**

A moDS-ek és a GEN2.2 sejtek fenotípusos elemzéséhez a sejteket sejt felszíni fehérjék ellen termeltetett, fluoreszcens festékekkel konjugált specifikus monoklonális antitestekkel jelöltük. A sejtek életképességét 7-aminoaktinomicin D (7-AAD) festéssel határoztuk meg. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur áramlási citométerrel mértük, és az adatokat FlowJo szoftverrel értékeltük ki.

### **IV.4 Western blot analízis**

A western blothoz a sejteket Laemmli pufferben lizáltuk, majd 100 °C-on 10 percig főztük. A mintákat 7,5 vagy 10%-os SDS-PAGE-n szétválasztottuk, majd elektrotranszferrel nitrocellulóz membránokra blottoltuk. 5% sovány tejjel történő blokkolást követően a membránokat specifikus primer antitestekkel reagáltattuk. Béta-aktint használtunk kontrollként. A membránhoz kötődött primer antitesteket egér- vagy nyúlellenes toma-peroxidáz-konjugált másodlagos antitestekkel konjugáltuk 1:5000, illetve 1:10000 hígításban. Ezután a specifikus fehérje sávokat ECL rendszerrel, SuperSignal West Pico vagy Femto kemilumineszcens szubsztrátot használva röntgenfilm expozícióval vizualizáltuk. Az immunreaktív sávok denzitometriai elemzését az Image Studio Lite szoftver 5.2-es verziójával végeztük.

### **IV.5 Kvantitatív valós idejű PCR**

Elsőként RNS-t izoláltuk  $5 \times 10^5$  sejtől Tri Reagent felhasználásával, a gyártó utasítását követve. A teljes RNS izolátumot kezeltünk 1  $\mu$ g DNáz I-gyel, hogy kizárjuk a genomiális DNS amplifikációját, majd az cDNA RT Kit segítségével reverz transzkripciót végeztünk, hogy cDNS-sé írjuk át. A reakció során a vizsgálandó génekre specifikus primereket használtunk. A kvantitatív PCR-t az ABI StepOne Real-Time PCR rendszer segítségével végeztük, és a ciklus küszöbértékeit (cT) a StepOne v2.1 szoftverrel határoztuk meg. Az adott mRNS normalizált expresszióját minden kísérletben a PPIA háztartási génre történő normalizálással kaptuk meg.

### **IV.6 Enzim-kötött immunoszorbens esszé (ELISA) és laktát esszé**

Kezeléseket követően a sejt kultúrák felülúszóit a megadott időpontokban összegyűjtöttük és az IFN- $\alpha$  szinteket a VeriKine™ Human Interferon Alpha ELISA kit segítségével mértük, míg az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 és TNF- $\alpha$

koncentrációjának meghatározásához a BD-OptEIA humán ELISA kiteket használtuk a gyártó utasításait követve. A sejtek laktát termelését a Glycolysis Cell-Based Assay Kit alkalmazásával detektáltuk a gyártó által megadott protokoll alapján. A minták abszorbancia értékeit az ELISA és a laktát esszé esetében is Synergy HT mikrolemez-olvasóval detektáltuk. Az ELISA abszorbancia méréseket 450 nm-en, míg a laktát esszé méréseit 490 nm-en végeztük.

#### **IV.7 Az intracelluláris reaktív oxigén származékok (ROS) termelésének mérése humán moDS-ekben**

Az endotoxinokkal történő kísérletek kapcsán az 5 napos humán moDS-eket 50  $\mu\text{M}$  fluoreszcens 2',7'-dihidrodiklór-fluorescein-diacetáttal (H2DCFDA) töltöttük fel, majd 2 órás LPS aktiválást követően a DCF fluoreszcencia intenzitásának változásait FACS Calibur Flow Cytometer segítségével értékeltük az FL1 (530  $\pm$  15 nm) csatornában, és az adatok elemzését a FlowJo v. 5.7.2 szoftverrel végeztük.

#### **IV.8 T-sejtek proliferációjának és aktivitásának vizsgálata áramlási citometriával**

A DS-T-sejt ko-kultúrák esetében az előzetesen kezelt moDS-eket és primer humán pDS-eket kétszer mostuk, majd allogén naív CD8<sup>+</sup> T-sejtekkel ko-kultiváltuk anti-humán CD3 monoklonális antitest jelenlétében. A T sejtek proliferációjának vizsgálatokor a T-sejteket a ko-kultiváció előtt 0,5  $\mu\text{M}$  fluoreszcens karboxi-fluorescein szuccinimidil-észterrel (CFSE) töltöttük. Öt napos ko-kultivációt követően a T-sejtek CFSE fluoreszcencia intenzitását BD FACS Calibur áramlási citométer segítségével detektáltuk.

Az intracelluláris citokin festéshez a ko-kultivációt követően a T-sejteket újrástimuláltuk forbol-mirisztát-acetáttal és ionomicinnel, fehérje transzport inhibitor, azaz monenzin jelenlétében 5 órán át. Ezt követően a sejteket anti-CD8-FITC-vel és megfelelő izotípusú kontroll antitesttel inkubáltuk, majd fixáltuk és permeabilizáltuk a sejteket BD Cytotfix/Cytoperm oldattal. A sejteket ezután APC-konjugált anti-IFN- $\gamma$  és anti-Granzim B antitestekkel és megfelelő izotípusú kontroll antitestekkel reagáltattuk. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur áramlási citométerrel mértük, és az adatokat FlowJo szoftverrel értékeltük.

## **IV.9 T-sejtek citokin termelésének vizsgálata enzim-kötött immunospot (ELISPOT) módszer segítségével**

Az előzetesen kezelt moDS-eket autológ vagy allogén humán CD3<sup>+</sup> pan-T-sejtekkel ko-kultiváltuk, majd négy napos ko-kultivációt követően az IFN- $\gamma$  termelő T-sejtek számát a humán IFN- $\gamma$ -ra specifikus kereskedelmi forgalomban kapható ELISPOT kit-tel határoztuk meg a gyártó utasításait követve.

### **IV.10 *In vivo* egérkísérletek**

Hat hetes nőstény BALB/c egerek (4-10 csoport, csoportonként 8 egér) ketreceit (takarmány és alom) 70 napon át naponta kezeltük 5  $\mu$ g N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel 5 ml endotoxin mentes vízben oldva aeroszolos spray formájában. Kontrollként csak endotoxin mentes vizet használtunk. A 70 napos LPS kezelési periódus alatt az egereket a 60. és 64. napon intraperitoneálisan kétszer szenitizáltuk endotoxin-mentes parlagfű pollen kivonattal. A 71. napon, amikor az LPS-kezelések befejeződtek, intranazálisan adott RWE-vel váltottuk ki az allergiás gyulladást az állatokban. Ezután 72 órával az allergénnel való kezelést követően az egereket termináltuk és a bronchoalveoláris mosófolyadékából (BALF) származó gyulladásozó sejteket elemeztük. A sejtek tárgylemezre való cito-centrifugálása után a preparátumokat Wright-Giemsa-val megfestettük és fénymikroszkóp segítségével meghatároztuk a sejszámokat.

Az állatok gondozása és kezelése a Helsinkai Nyilatkozat és az Európai Unió előírásait, valamint az IASP Kutatási és Etikai Kérdések Bizottságának irányelveit követte. Az összes állatkísérlet jóváhagyta a Debreceni Egyetem Állatgondozói és Védelmi Bizottsága (#7/2011/DE MAB). Az állatokat a Debreceni Egyetem kórokozómentes állatházában tartottuk, ahol az élelmet és vizet tetszés szerint elérhették az állatok.

### **IV.11 Statisztikai analízis**

Az adatokat az ábrákon átlag  $\pm$  szórásként (SD) ábráztuk. Az eloszlások meghatározásához Shapiro-Wilk tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzéshez normál eloszlás esetén egyutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, Bonferroni post-hoc teszttel. Nem normál eloszlásnál a statisztikai elemzéshez Kruskal-Wallis tesztet használtunk, Dunn's post-hoc teszttel kiegészítve. A statisztikailag szignifikáns

különbségek meghatározására a GraphPad Prism v.6 szoftvert használtuk. A különbségeket  $p < 0,05$  értéknél tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## V. Eredmények

### V.1 Endogén immunmoduláció: mTOR szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek RLR aktiváció indukált immunválaszaiban

#### V.1.1 mTOR aktivitás vizsgálata az RLR aktivált moDS-ekben

Az mTOR szabályozó szerepét a DS-ek immunválaszaiban elsőként moDS-ekben vizsgáltuk specifikus mTOR inhibitorok alkalmazásával. Kísérleteinkhez az mTORC1 specifikus gátlószerét, a rapamycint és az ATP-kompetitív katalitikus inhibitorát, az AZD8055-t használtunk, mely az ATP kötő helyet célozza meg az mTOR doménben, így mindkét mTOR komplex aktivitását képes egyszerre gátolni. Elsőként kimutattuk, hogy az moDS-ekben alap szinten is kifejeződő a RIG-I és MDA5 receptorok szintjét az mTOR gátlása nem befolyásolja.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az RLR-ek által mediált jelátvitel aktiválja-e az mTOR szignalizációt a moDS-ekben. Először az mTORC1 legfontosabb célmolekulájának, az S6K-nak (p70S6K, Thr389), valamint az mTORC2 downstream célpontjának számító Akt-nak (Ser473) a foszforilációját vizsgáltuk specifikus RIG-I stimuláció (3p-hpRNS) hatására. Eredményeink azt mutatták, hogy a RIG-I stimuláció szignifikánsan fokozta a p70S6K (Thr389) foszforilációját, ami 1 óra aktiválást követően érte el a csúcspontját, ugyanakkor a p70S6K foszforilációját jelentősen gátolta a rapamycin és az AZD8055 előkezelés is. Az Akt (Ser473) foszforilációja is 1 óránál fokozódott szignifikánsan, melyet az AZD8055 gátolt hatékonyan. Párhuzamos kísérletekben a moDS-eket polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup> komplex-szel kezeltük. A polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup> komplexet az MDA5 előnyben részesíti a RIG-I-gyel szemben, így főként az MDA5 aktivátoraként tartják számon. A polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup>-vel végzett aktiváció a p70S6K és az Akt foszforilációját is egyaránt szignifikánsan növelte, a p70S6K 1 óra, míg az Akt 3 óra aktiválás után érte el a legmagasabb foszforiláltsági szintjét. Az mTORC1 specifikus inhibitora a rapamycin az mTORC1 célmolekulájának, a p70S6K-nak a foszforilálódását gátolta, míg az Akt-ot nem. Ugyanakkor a kettős mTORC1/2 inhibitor, az AZD8055 hatékonyan gátolta mind a p70S6K-nak, mind az mTORC2 célmolekulájának, az Akt-nak a foszforilációját a polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup>-vel aktivált moDS-ekben. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az

RLR-eken keresztül történő aktiváció az mTOR jelátviteli útvonalak aktivitását indukálják moDS-ekben, mutatva az RLR receptorok mTOR függőségét.

### ***V.1.2 Az mTOR gátlás hatása a moDS-ek RLR közvetített metabolikus változásaira***

Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy a moDS-ek és a pDS-ek RIG-I általi aktivációjának különböző metabolikus feltételei vannak. Humán moDS-ekben a RIG-I aktiváció oxidatív foszforilációról glikolízisre történő metabolikus váltást eredményez, ami elősegíti a sejtek I-es típusú IFN termelését és fokozza T-sejt aktiváló képességüket. Ezzel szemben a pDS-ek RIG-I által közvetített vírusellenes válasza nem igényel glikolízisre való átállást. Továbbá ismert az is, hogy az mTOR aktiváció segíti a glikolízist a DS-ekben TLR stimulációt követően. Ugyanakkor az irodalomban még nem volt adat arra nézve, hogy az mTOR milyen szerepet tölthet be az RLR-stimulált moDS-ek metabolikus átprogramozásában. Ezért a továbbiakban mTOR gátlók jelenlétében megvizsgáltuk az RLR-aktivált moDS-ek glikolízissel összefüggő génjeinek expresszióját, valamint vizsgáltuk a laktát koncentrációt is a sejtek felülűszójában. Eredményeink azt mutatták, hogy az RLR stimulált moDS-ekben jelentősen fokozódott a glikolitikus gének (*LDHA*, *HK2* és *HIF1A*) expressziója és a laktát termelődése is, amit az mTOR inhibitorok minden esetben gátoltak. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az mTOR elengedhetetlen a moDS-ek RLR által közvetített glikolitikus átprogramozásához is.

### ***V.1.3 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata az RLR-stimulált humán moDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban***

A fenotípusos analízis során a sejtfelszíni markerek közül a CD83 aktivációs marker, a kostimuláló CD40, CD80 és CD86 molekulák, valamint az MHC molekulák, úgymint a HLA-DQ és HLA-ABC expresszióját vizsgáltuk. Eredményeink szerint az mTOR gátlók önmagukban nem befolyásolták ezen fehérjéknek az alapszintű expresszióját az moDS-eken, viszont az RLR agonisták, jelentősen növelték a sejtfelszíni aktivációs molekuláinak a kifejeződését. Ugyanakkor sem a rapamycin, sem az AZD8055 nem volt képes szignifikánsan gátolni a moDS-ek RLR stimuláció indukált fenotípusos érését.

Következő lépésben a kezelt moDS-ek felülűszójában vizsgáltuk a termelt citokinek koncentrációját 24 órás aktivációt követően ELISA módszer segítségével. A vizsgált citokinek között szerepelt a fő antivirális mediátor, az I-es típusú IFN-okhoz

tartozó IFN- $\alpha$ , valamint az IL-6 és TNF pro-inflammatórikus citokinek. Megállapítottuk, hogy a kezeletlen moDS-ek nem szekretálják az I-es típusú IFN-okat, és gyulladáscsökkentő citokinek is csak nagyon kis mértékben termelnek, melyek alapszintjét az mTOR gátlás nem befolyásolja. Ugyanakkor a 3p-hpRNS vagy a polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup> kezelés mellett nagymértékben indukálódott az IFN- $\alpha$ , IL-6 és TNF citokinek termelődése a moDS-ekben, melyet az mTOR gátlása szignifikánsan csökkentett. Megfigyeléseink megerősítése érdekében ezen kísérleteinket elvégeztünk élő vírussal is. A moDS-ek aktivációjához élő VSV vírust használtunk, melynek RNS genomja főként az RLR-eken történő aktivációt biztosítja. A szintetikus ligandumokhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy a VSV fertőzés fokozta az IFN- $\alpha$ , IL-6 és TNF citokinek termelődését a sejtekben, melyet a rapamycin és az AZD8055 az mTOR gátlása révén jelentősen csökkentett. Így összességében elmondható, hogy az mTOR gátlása nem befolyásolja a moDS-ek fenotípusos érését, viszont az aktivált moDS-ek citokin termelése mTOR függést mutat.

Mivel a TBK1-nek kiemelt szerepe van az RLR jelátvitelben, megvizsgáltuk a TBK1 foszforiláció kinetikáját mTOR inhibitorok jelenlétében western blot módszerrel és azt tapasztaltuk, hogy az RLR aktiváció indukált TBK1 foszforiláció szignifikánsan csökkent, ha a sejteket aktivációt megelőzően mTOR inhibitorokkal kezeltük elő. A p38 MAPK útvonal szerepének vizsgálatakor ugyanakkor azt tapasztaltuk, hogy a p38 foszforilációja alap szinten is magas a sejtekben, amit sem az RLR agonistákkal, sem az mTOR gátlókkal történő kezelés nem változtatott meg szignifikánsan. Így összességében elmondható, hogy moDS-ekben az mTOR komplex főként a TBK1 aktivitás szabályozása révén befolyásolhatja a sejtek citokin termelését.

#### ***V.1.4 Az mTOR aktivitás vizsgálata az RLR aktivált humán pDS-ekben***

A humán perifériás vérben keringő pDS-ek száma korlátozott, ezért ezen kísérleteink nagy részét a humán GEN2.2 pDS sejtvonallal végeztük, mely a primer humán pDS-ekhez hasonló fenotípusos és funkcionális tulajdonságokat mutat. Elsőként kimutattuk, hogy hasonlóan a moDS-ek esetében kapott eredményekhez az mTOR gátlás nem változtatja meg az RLR receptorok kifejeződését a sejtekben. Továbbá a western blot analízis eredményei azt mutatták, hogy a moDS-ekhez hasonlóan a pDS-ek 3p-hpRNS-sel vagy polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup> -vel történő kezelése is szignifikánsan megnövelte a p70S6K és Akt foszforilációját, ami a csúcsát 1 órás aktivációt követően érte el. Ezen

eredményeink azt mutatják, hogy az RLR-ek aktivációja a pDS-ek esetében is fokozza az mTOR aktivitást. Ugyanakkor a rapamycinnel végzett előkezelés gátolta a p70S6K foszforilációját az aktiválatlan és az aktivált sejtekben egyaránt. Az mTORC1/mTORC2 kettős inhibitor, az AZD8055 pedig blokkolta mindkét mTOR célmolekula foszforilációját. Megállapítottuk továbbá, hogy a rapamycin kezelés önmagában az Akt foszforiláció növekedéséhez vezet, ami az mTORC1 és a p70S6K negatív visszacsatolási hurok elvesztésével magyarázható. Ezen eredményeink összhangban vannak a moDS-ek esetében kapott adatokkal, így elmondható, hogy az mTOR fontos szabályozó szereppel bírhat az RLR által közvetített immunválaszok szabályozásában mind moDS-eknél, mind pDS-eknél.

### ***V.1.5 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata az RLR-aktivált humán pDS-ek fenotípusos és funkcionális változásaiban***

Az moDS-ekkel ellentétben az RLR aktiváció a GEN2.2 sejtek esetében nem fokozta a CD40, CD80 és CD86 kostimulációs és a HLA antigén-prezentáló molekulák expressziós szintjeit és a moDS-ekhez hasonlóan az mTOR inhibitorokkal történő előkezelés sem eredményezett különbséget ezen fehérjék expressziós szintjeiben. Ezzel ellentétben RLR aktiváció következtében jelentősen megnőtt a CD83 aktivációs marker szintje, ami érdekes módon az AZD8055-tel előkezelt sejtek esetében tovább fokozódott, mely az mTOR valamilyen szelektív szabályozó mechanizmusára utalhat a pDS-ekben. Ezt követően megvizsgáltuk az mTOR gátolt és RLR aktivált GEN2.2 sejtek IFN- $\alpha$ , IL-6 és TNF pro-inflammatórikus citokinjeinek szekrécióját. Kapott eredményeink összhangban vannak a moDS-ek esetében tapasztalt változásokkal, miszerint az IFN- $\alpha$ , IL-6 és TNF citokinek szekréciója jelentősen megnőtt az RLR-stimuláció hatására. Ugyanakkor az RLR-stimulált GEN2.2 sejtekben az mTOR inhibitorok szignifikánsan csökkentették az IFN- $\alpha$  és a gyulladásgátló citokinek termelődését. Eredményeink további megerősítése érdekében hasonlóan az moDS vizsgálathoz, az élő vírussal fertőzött GEN2.2 sejtek citokin termelését is megvizsgáltuk, és megállapítottuk, hogy az mTOR gátlása nagymértékben csökkenti a sejtek VSV által indukált citokin szekrécióját is. Továbbá az RLR aktiváció a pDS-ek esetében is indukálja a TBK1 foszforilációját, ami 3 óránál érte el a csúcspontját. A TBK1 foszforilációja ugyanakkor jelentősen csökkent az mTOR gátlás következtében. A p38

foszforiláció szintje a GEN2.2 sejtek esetében sem változott szignifikánsan RLR stimuláció hatására és az mTOR gátlás sem befolyásolta a foszforiláció szintjét.

Összességében eredményeink arra utalnak, hogy hasonlóan a moDS-ekhez, az mTOR fontos szabályozó szerepet tölt be a pDS-ek RLR-közvetített I-es típusú IFN és pro-inflammatórikus citokin válaszaiban, valószínűleg a TBK1 aktivitás szabályozása révén.

### ***V.1.6 Az mTOR szabályozó szerepének vizsgálata a humán DS-ek T-sejt aktiváló funkcióiban***

Eredményeink azt mutatják, hogy a 3p-hpRNS-sel vagy polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup> -vel kezelt moDS-ek és primer pDS-ek jelentős mértékben indukálják a CD8<sup>+</sup> T-sejtek proliferációját. Azonban a T-sejtek proliferációja gátlódik, ha az RLR-stimuláció előtt rapamycinnel előkezeltük a moDS-eket és a primer pDS-eket. Az AZD8055 kettős mTOR inhibitor ugyanakkor sokkal gyengébbnek bizonyult és a rapamycinhez képest jóval kisebb mértékben tudta csak gátolni a moDS-ek T-sejtek proliferációt indukáló hatását. A primer pDS-ek esetében pedig az AZD8055 nem befolyásolta szignifikánsan az RLR aktiváció által stimulált sejtek naív T-sejt proliferációt indukáló képességét.

Párhuzamos kísérletek során megállapítottuk, hogy a 3p-hpRNS-sel vagy polyI:C/LyoVec<sup>TM</sup> -vel aktivált moDS-ek indukálták a CD8<sup>+</sup> T-sejtek IFN- $\gamma$  és granzim B termelését. Ha azonban az moDS-eket az RLR aktivációt megelőzően rapamycinnel kezeltük, az moDS-ek CD8<sup>+</sup> T-sejteket aktiváló képessége jelentősen csökkent, amit viszont az AZD8055 előkezelés esetében nem tapasztaltunk. Ezen kísérleteket megismételve primer pDS-ekkel az moDS-ekhez hasonló eredményeket kaptunk. Ezen megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a humán DS-ek T-sejt aktiváló képessége főként szelektív mTORC1 gátlással befolyásolható, míg az mTORC1 és mTORC2 együttes gátlása valószínűleg elindíthat valamilyen kompenzáló mechanizmust, ami segítheti a DS-ek megfelelő antigén prezentálását és ezáltal T-sejt aktiváló képességét, de ezen feltételezés alátámasztása a jövőben további vizsgálatokat kíván.

## **V.2 Exogén immunmoduláció: A sugárzással méregtelenített LPS immunmoduláló hatásának vizsgálata humán moDS-eken**

### ***V.2.1 A natív és sugárdetoxifikált endotoxin humán moDS-ek életképességére és fenotípusos éréseire gyakorolt hatásainak vizsgálata***

Alábbi kísérletsorozatunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a sugárzással szerkezetileg módosított endotoxin a natív formához képest milyen különbségeket mutat a humán moDS-ekre kifejtett immunmoduláló hatásaiban.

Miután megbizonyosodtunk róla, hogy sem az N-LPS és sem az RD-LPS nem befolyásolja az moDS-ek életképességét az általunk alkalmazott dózisban, megvizsgáltuk az N-LPS és az RD-LPS intracelluláris ROS-indukáló képességét redox-érzékeny fluoreszcens festékkel (H<sub>2</sub>DCF-DA). Az endogén módon generált ROS ugyanis alapvető a DS-ek antigén prezentáló funkciójához. Eredményeink szerint a moDS-ek N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel történő kezelése a DCF fluoreszcencia szignifikáns növekedését eredményezte, viszont nem volt szignifikáns különbség a DCF fluoreszcencia intenzitásában az N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezelt sejtek között, ami a két különböző típusú LPS azonos intracelluláris ROS-indukáló kapacitását jelzi.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a gamma-sugárzás hogyan befolyásolta az LPS immunstimuláló hatását, ami indukálhatja az moDS-ek fenotípusos érést, amely szükséges a T-sejtekkel való kölcsönhatáshoz és a T-sejtek aktivációjának beindításához. A moDS-ek fenotípusos változásainak vizsgálatához különböző sejtfelszíni fehérjék, köztük a CD83 érési marker, a HLA-DQ antigénprezentáló molekula és a CD40, CD80 és CD86 kostimuláló molekulák expressziós szintjeinek változásait mértük 24 óras endotoxin stimulációt követően áramlási citometriával. Eredményeink azt mutatják, hogy mind az N-LPS, mind az RD-LPS szignifikánsan növelte az összes vizsgált sejtfelszíni fehérje expresszióját a kezeletlen sejtekhez képest. Azonban nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget a két féle LPS moDS-aktiváló potenciálja között. Összességében ezen eredményeink alapján megállapítható, hogy az N-LPS és az RD-LPS hasonló mértékben képes indukálni a humán moDS-ek érést.

### ***V.2.2 Az N-LPS és az RD-LPS hatásainak vizsgálata a humán moDS-ek citokin termelésére***

Eredményeink szerint az LPS mindkét formája képes volt jelentősen növelni a moDS-ek összes mért citokin (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 és IL-1 $\beta$ , IL-10) és kemokin (IL-8)

szekrécióját. Bár az RD-LPS-sel kezelt moDS-ek felülúszójában alacsonyabb citokin- és kemokin koncentrációkat mutattunk ki, mint az LPS natív formájával kezelt sejtek felülúszójában, szignifikáns különbségeket a besugárzott és a natív LPS hatásai közötti csak az IL-1 $\beta$  és az IL-10 szintjében tudtunk detektálni. Megállapítottuk továbbá, hogy az RD-LPS által indukált fehérjeszekréció az N-LPS-hez hasonlóan TLR4-függő az moDS-ekben, mivel a vizsgált citokinek koncentrációja specifikus TLR4 gátlás mellett mind az N-LPS-sel, mind az RD-LPS-sel történő stimulálást követően a kontroll minták szintjén maradt. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy az endotoxin sugárzással méregtelenített formáját is képesek a moDS-ek TLR4-en keresztül felismerni, így az RD-LPS megtartotta a TLR4-hez való kötődési képességét.

### ***V.2.3 Az N-LPS és az RD-LPS endotoxin toleranciát indukáló képességének vizsgálata humán moDS-ekben***

Az endotoxin tolerancia vagy LPS tolerancia olyan védelmi mechanizmus, amelyben az alacsony endotoxin koncentrációnak kitett sejtek olyan átmeneti állapotba kerülnek, ami csökkenti érzékenységüket egy második endotoxin dózissal szemben. A DS differenciáció 4. napján a humán moDS-eket alacsony dóziszú LPS-sel (5 ng/ml) előkezeltük, és a 6. napon újra nagy dóziszú LPS-nek (250 ng/ml) tettük ki. Majd 24 órás kezelést követően ELISA-val meghatároztuk az IL-12, az IL-1 $\beta$  és az IL-10 koncentrációját a sejt kultúrák felülúszóiból. Kísérletünkben az moDS-ek N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel történő restimulációja is az IL-12, IL-1 $\beta$  és IL-10 citokinek szignifikánsan alacsonyabb koncentrációját eredményezte a sejtek felülúszóiban, az egyszeri nagy dóziszú LPS kezeléshez képest. Azonban nem volt szignifikáns különbség a felszabadult citokinek mennyiségében az N-LPS-reaktívált moDS-ek és az RD-LPS-reaktíváltak között, kivéve az IL-10 citokin esetében. Ugyanis mind az egyszeri nagy dóziszú, mind az ismételt N-LPS kezelések szignifikánsan magasabb szintű IL-10 termelést indukáltak, mint az RD-LPS-sel történő hasonló kezelések. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az N-LPS és az RD-LPS is képes endotoxin toleranciát kiváltani a sejtekben, ugyanakkor mind az RD-LPS egyszeri dóziséval aktivált, mind az RD-LPS-sel restimulált moDS-ek alacsonyabb kapacitással rendelkeznek az IL-10 citokin előállítására, mint az endotoxin natív formájának kitett sejtek.

#### ***V.2.4 Az N-LPS és az RD-LPS T-sejt aktiváló hatásainak vizsgálata humán moDS-ekben***

Miután kimutattuk, hogy van különbség az N-LPS és RD-LPS moDS-ek citokin válaszát befolyásoló hatásaiban, kíváncsiak voltunk arra, hogy van-e valamilyen eltérés az N-LPS-sel aktivált és az RD-LPS-sel aktivált humán moDS-ek T-sejt polarizációt kiváltó hatásai között. Eredményeink szerint az RD-LPS-nek kitett humán moDS-ek sokkal erőteljesebben indukálják a Th1 irányú polarizációt, mint az LPS natív formájával aktivált sejtek mind autológ, mind allogén rendszerben.

#### ***V.2.5 Az RD-LPS mirisztinsav tartalmával összefüggő immunmoduláló hatások vizsgálata***

Mivel eredményeink azt mutatták, hogy az N-LPS és az RD-LPS ugyanolyan mértékben képes indukálni a moDS-ek fenotípusos érését, az RD-LPS aktivált moDS-ek erősebb Th1 irányú polarizációt kiváltó kapacitása nem magyarázható az endotoxinok DS érésére gyakorolt eltérő hatásával. Ugyanakkor az IL-10 indukáló képessége a kétféle endotoxinnak eltérő volt, így a további kísérleteinkben megpróbáltuk feltárni ezen megfigyelésünk molekuláris hátterét. Feltételeztük, hogy a két endotoxin készítmény eltérő immunstimuláló képessége abból adódhat, hogy az RD-LPS esetében az ionizáló sugárzás következtében az endotoxin szerkezete megbomlik és különböző szabad zsírsavak szabadulnak fel, melyek immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkezhetnek. Korábban megállapították, hogy a 150 kGy erősségű <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -sugárzás lebontotta az LPS szerkezetében található egyszerű cukrokat és így csökkentette a poliszacharid rész antigenitását. Az endotoxin lipid-A zsírsavai közül pedig a  $\beta$ -hidroximirisztinsav részlegesen átalakult mirisztinsavvá, vagy szelektíven lebomlott. Így megvizsgáltuk LPS készítményeinkben a szabad zsírsavak, a  $\beta$ -hidroximirisztinsav koncentrációját nagy teljesítményű folyadékromatográfiás tömegspektrometriával (HPLC-MS) és azt találtuk, hogy a  $\beta$ -hidroximirisztinsav koncentráció háromszor magasabb volt az RD-LPS-ben (1,82  $\mu$ g/ml 1 mg/ml LPS-ben), mint az N-LPS-ben (0,53  $\mu$ g/ml 1 mg/ml LPS-ben).

Ezen eredmények alapján feltételeztük, hogy az RD-LPS-ben található szabad mirisztinsav származék magasabb koncentrációja befolyásolhatja az RD-LPS-nek kitett moDS-ek IL-10-indukáló potenciálját, ami alacsonyabb IL-10 termeléshez vezethet.

Ezen hipotézisünk tesztelésére megvizsgáltuk az alacsonyabb mirisztinsav tartalommal rendelkező natív endotoxin IL-10 indukáló kapacitását mirisztinsav jelenlétében. Eredményeink szerint a mirisztinsavas kezelés önmagában nem változtatta meg az IL-10 alap szekréciós szintjét a moDS-ekben, de teljesen gátolta a sejtek N-LPS által indukált IL-10 szekrécióját. Így az RD-LPS készítményben lévő magasabb mirisztinsav szint felelős lehet az RD-LPS-sel kezelt moDS-ek csökkent IL-10 termeléséért, és valószínűleg az alacsonyabb IL-10 szint mellett a Th1 felé történő polarizáció kifejezettebb lehet.

### ***V.2.6 Az RD-LPS immunmoduláló hatásának vizsgálata a pollen által kiváltott légúti allergiás gyulladás egérmódeljében***

Korábbi irodalmi adatok szerint a légutakban lévő mieloid DS-ek kulcsszerepet játszanak a belélegzett antigénnel szembeni szenitizációban és a Th2-függő légúti eozinofília kialakításában. Mivel eredményeink azt mutatták, hogy az RD-LPS-sel kezelt humán moDS-ek erősebb Th1 polarizációt képesek kiváltani, mint az N-LPS-sel kezelt humán moDS-ek, feltételeztük, hogy az RD-LPS T-sejt polarizációt befolyásoló hatása a Th2 gyulladással asszociált allergiás reakciók esetében képes lehet csökkenteni a Th2 gyulladás tüneteit, azáltal, hogy erősíti a Th1 dominanciát. Így megvizsgáltuk az RD-LPS immunmoduláló hatását *in vivo* pollen által kiváltott légúti allergiás gyulladás egérmódeljében is.

Egér kísérleteinkben elsőként megvizsgáltuk az endotoxin készítmények toxicitását és megállapítottuk, hogy az RD-LPS szemben az N-LPS-sel nem toxikus az egerekre. Továbbá a korábbi limulus amoebocita lizátum (LAL) vizsgálat eredményei is azt mutatták, hogy az RD-LPS limulus reaktivitása elenyésző volt az N-LPS-hez képest (limulus reaktivitás: RD-LPS/N-LPS=1/1000).

Ezt követően hathetes nőstény BALB/c egerek ketreceit 70 napon keresztül naponta kezeltük 5 µg N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel és kontrollként endotoxin-mentes vízzel (H<sub>2</sub>O) aeroszolos spray formájában, majd endotoxin-mentes parlagfű pollenkivonattal (RWE) váltottuk ki az allergiás gyulladást. Azon egerek esetében, ahol az egerek környezetét kontrollként endotoxin-mentes H<sub>2</sub>O-val kezeltük, majd RWE expozícióval kiváltottuk a Th2 allergiás gyulladást, az össz-sejtszám és az eozinofil sejtszám is jelentős növekedést mutatott az állatok BALF mintáiban. Ha az egerek környezetét az N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel kezeltük 70 napig, majd ezt követően

váltottuk ki bennük az allergiás gyulladást, a BALF minták sejtszámának enyhe csökkenését detektáltuk, azonban ezen változások statisztikailag nem voltak szignifikánsak. Viszont az N-LPS-sel ellentétben az RD-LPS-ben gazdag környezet mellett szignifikáns csökkenést detektáltunk az allergizált egerek eozinofil számában, mely sejtek az allergiás reakciók fő gyulladásozó komponensei, és számuk a legjobban korrelál a tüdő funkciókkal és a Th2-típusú légúti gyulladás mértékével. Így ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a környezet gazdagítása a nem toxikus RD-LPS-sel védelmet biztosíthat a parlagfű pollen által kiváltott légúti allergia ellen.

## **VI. Megbeszélés**

### **VI.1 DS funkciók endogén szabályozása: Az mTOR szerepe a humán DS-ek RLR-által közvetített vírusellenes válaszaiban**

Az elmúlt évtizedben számos tanulmányban az mTOR komplexet a TLR-mediált DS funkciók központi, endogén szabályozójaként azonosították, viszont az mTOR szerepét a humán DS-ek RLR-függő antivirális válaszában még nem vizsgálták, holott a DS-ek citoplazmájában a virális eredetű nukleinsavak felismerését és az aktívan replikálódó vírusok elleni immunválaszokat főként az RLR-ek közvetítik.

A PI3K/mTOR által közvetített endogén szabályozó mechanizmusok a DS-ek aktiválódását, túlélését, érését, citokin termelését és T-sejt-stimuláló képességét is befolyásolják. Továbbá számos RLR-t aktiváló vírus is befolyásolja a PI3K/Akt/mTOR jelátvitelt a fertőzött sejtekben, hogy elősegítse a sejtek túlélését és gátolja az apoptózist. Ezen korábbi megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az RLR-ek által közvetített immunválaszok is mTOR szabályozás alatt állhatnak, amit saját kísérletes munkánk eredményeivel közvetlenül is igazoltunk. Kimutattuk ugyanis, hogy hasonlóan a TLR jelátvitel aktiválásához, a humán DS-ek specifikus RLR-stimulálása is kiváltja az mTOR jelátviteli útvonal aktiválódását. Megállapítottuk, hogy a moDS-ek és a pDS-ek aktiválása RIG-I/MDA5 specifikus ligandumokkal szignifikánsan fokozta a p70S6K és az Akt foszforilációt, ami a megnövekedett mTORC1 és mTORC2 aktivitást tükrözi. Korábbi tanulmányokban leírták, hogy az mTOR útvonal központi szerepet játszik a DS-ek aktivációt követő metabolikus változásainak koordinálásában is és segíti a glikolitikus átprogramozást. Kimutattuk, hogy a rapamycin és az AZD8055 egyaránt jelentősen csökkentette a glikolízis végtermékének, a laktátnak a termelődését és a glikolízissel

kapcsolatos gének kifejeződését az RLR stimulált moDS-ekben, ami tükrözi az mTOR gátlás hatására bekövetkező csökkent glikolitikus aktivitást.

Az irodalomban számos, sokszor ellentmondásos eredmény található arról, hogy az mTOR pozitív vagy negatív szabályozó szerepet játszik-e a DS-ek különböző altípusainak TLR által mediált fenotípusos érésében és citokin termelésében. Saját vizsgálataink eredményei egyértelműen bizonyítják, hogy az mTOR az RLR-közvetített citokin válaszok alapvető pozitív szabályozójaként funkcionálhat a humán DS-ekben, mivel a rapamycin és az AZD8055 egyaránt jelentősen csökkentette mind a moDS-ek, mind a pDS-ek RLR által közvetített IFN- $\alpha$ , IL-6 és TNF citokin szekrécióját. Eredményeink összhangban vannak azokkal a korábbi tanulmányokkal, melyek beszámoltak arról, hogy az mTOR gátlás csökkenti a VSV által kiváltott IFN- $\alpha$  termelést Flt3L-függő DS-ekben. Továbbá, mivel mindkét mTOR inhibitor jelenlétében csökkent TBK1 foszforilációt detektáltunk az RLR aktiválást követően, azt feltételezzük, hogy az mTOR a TBK1 foszforilációval szabályozza a humán DS-ek-ben a RLR indukált citokin termelést.

Ellentétben a citokin válaszokkal, az mTOR gátlásakor nem tudtunk kimutatni szignifikáns változásokat az RLR-stimulált DS-ek fenotípusában, kivéve a pDS-ek CD83 expressziójában, amit az AZD8055 előkezelés tovább fokozott az RLR-stimulált sejtekben. Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy rapamycin előkezelés mellett a CD83 szint emelkedett a TLR-aktivált CD1c<sup>+</sup> cDS-ekben, de nem moDS-ekben. Mindezen adatok arra utalnak, hogy az mTOR DS-ek fenotípusát befolyásoló hatásai nagymértékben függenek a sejtípustól, az aktivációs módtól és a stimulált receptor típusától is. További eredményeinkkel igazoltuk, hogy az mTORC1 gátlószere, a rapamycin hatékonyan csökkenti az RLR-stimulált moDS-ek és pDS-ek CD8<sup>+</sup> T-sejtek proliferációt indukáló képességét. Azonban érdekes módon az AZD8055 kettős mTORC1/mTORC2 kináz inhibitor csak kis mértékben volt képes csökkenteni az RLR-stimulált moDS-ek T-sejt-proliferációt kiváltó képességét, miközben a pDS-eket nem befolyásolta. Megfigyelésünk összhangban van egy másik tanulmánnyal, mely kimutatta, hogy a rapamycin hatékonyabb gátlója az egér csontvelői DS-ek által indukált CD8<sup>+</sup> T-sejt proliferációnak, mint az AZD2014 kettős mTOR inhibitor, amelyet a rapamycinél 20-szor nagyobb dózisban kell alkalmazni a hasonló gátló hatás elérése érdekében. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy az mTOR inhibitorok magasabb dózisban

toxikusak a sejtekre, megfigyeléseink szerint is az AZD8055 100 nM-nél nagyobb dózisban jelentősen csökkenti az moDS-ek túlélését (ezen adatokat nem közöltük). Hasonlóképpen, a Torin-1, egy másik ATP-kompetitív mTOR inhibitor a rapamycinnel szemben kevésbé volt hatékony a TLR4-stimulált egér csontvelői DS-ek T-sejt stimuláló képességének csökkentésében.

Megállapítottuk továbbá, hogy a T-sejt proliferáció mellett, az AZD8055 az RLR-aktivált DS-ek CD8<sup>+</sup> T-sejtek citokin termelését indukáló képességét sem befolyásolta, szemben a rapamycinnel, ami szignifikánsan csökkentette azt. Ez a jelenség egy mTORC2 által mediált negatív visszacsatolási hurok elvesztésével magyarázható, amelyet a kettős mTOR inhibitorok elnyomnak. Ugyanis nemrégiben kimutatták, hogy az NPV-BEZ235 kettős PI3K/mTOR inhibitor túlaktiválja a mitogén-aktivált protein-kináz kináz (MEK)/extracelluláris szignál által szabályozott kináz (ERK) utat humán hasnyálmirigyrák sejtekben. A DS-ek PRR-ek útján történő stimulálása is különböző MAPK-ok aktiválásához vezet, amik közül a MEK/ERK jelátviteli út az antigén prezentáció pozitív szabályozójaként működik a moDS-ekben. Érdekes módon úgy tűnik, hogy az mTORC2 blokkolása önmagában inkább fokozza, mint gátolja a DS-ek T-sejt stimuláló képességét. Például az mTORC2 hiánya a bőrben lévő DS-ekben fokozott CD8<sup>+</sup> T-sejt effektor válaszokat és fokozott bőrgraft kilökődést váltott ki. Ezenkívül egérmódelben kimutatták, hogy az mTORC2 hiányos mieloid DS-ek fokozott allostimulációs képességgel rendelkeznek és nagyobb mértékben képesek indukálni az IFN- $\gamma$  és IL-17 termelő T-sejtek aktivációját TLR függő és TLR független stimulációt követően egyaránt. Az mTORC2-hiányos DS-ek fokozott antigén prezentáló képességének mechanizmusát egyelőre még nem tárták fel, így további vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy az mTORC1 és kettős mTORC1/C2 inhibitorok hatásai közötti különbségeket megmagyarázzuk. Ugyanakkor eredményeink rámutatnak arra, hogy az első és a második generációs mTOR gátlóknak a különböző immunsejtek funkcionálisára gyakorolt eltérő hatásait is figyelembe kell venni az új generációs mTOR inhibitorok fejlesztése során.

## **VI.2 DS funkciók exogén szabályozása: sugárdetoxifikált LPS immunmoduláló hatásainak vizsgálata humán moDS-eken**

A környezetünkben lévő exogén faktorok közül az endotoxinok immunmoduláló tulajdonságaik révén befolyásolhatják a humán DS-ek funkcióit, így a következőkben azt

vizsgáltuk, hogy az endotoxin méregtelenített formája milyen hatással lehet a humán DS-ek által mediált immunológiai folyamatokra. A higiéniai hipotézis szerint a korai életkorban a környezeti mikrobákkal és endotoxinjaikkal történő expozíció a veleszületett immunválasz hatékony aktivátora lehet, és védelmet nyújthatnak az atópiás betegségek kialakulása ellen. Azonban az endotoxinok immunmoduláló szerként való alkalmazását erősen korlátozza, hogy rendkívül mérgezőek, képesek klinikai tüneteket kiváltani, beleértve a sokkot, a lázat, a hidegrázást, a hörgőszűkületet és a nem specifikus bronchiális hiperreaktivitást. Ugyanakkor állatokon és embereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy az LPS 150 kGy erősségű, <sup>60</sup>Co gamma-sugárzással történő detoxifikálása megőrzi az endotoxin immunológiai adjuváns és immunmodulátor tulajdonságát és a detoxifikált forma védelmet nyújt az endotoxin sokk és a sugárzás okozta betegségek ellen, valamint stimulálja a természetes védekezőrendszert.

Kísérleteink során először megvizsgáltuk a natív és a sugárdetoxifikált endotoxinok humán moDS-ek funkcionális aktivitására gyakorolt hatását. *In vitro* kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az RD-LPS-nek kitett humán moDS-ek hasonló ROS képző képességgel bírnak, mint az RD-LPS-sel kezelt DS-ek és fenotípusos érésük is hasonló. Az endogén, intracelluláris ROS esszenciális mediátora a DS-ek általi antigénprezentációnak, a moDS-ek fenotípusos érése pedig szükséges a T-sejtekkel való kölcsönhatásokhoz.

További eredményeink szerint az LPS mindkét formája szignifikánsan növelte a moDS-ek citokin és kemokin szekrécióját, ugyanakkor az N-LPS-sel kezelt moDS-ekhez képest az RD-LPS-sel kezelt moDS-eket csökkent gyulladáshoz vezető potenciál jellemzett. Az összes mért szekretált citokin koncentrációja az N-LPS-sel stimulált moDS-ekhez képest csökkenő tendenciát mutatott, viszont az RD-LPS csak a gyulladáskeltő IL-1 $\beta$  és a gyulladáscsökkentő IL-10 esetében eredményezett szignifikánsan is alacsonyabb fehérjeszintet az N-LPS-hez képest. Az RD-LPS csökkent gyulladáskeltő hatása valószínűleg a detoxifikálásnak köszönhető. Korábbi vizsgálatok beszámoltak arról, hogy az ionizáló sugárzás módosítja az LPS szerkezetét és a poliszacharid részek lebomlását, valamint a lipid-A komponens megváltozását eredményezi. A sugárzás az RD-LPS készítményekben szignifikánsan csökkenti a glükózamin, a foszfát, a Kdo és a zsírsav komponenseket, ami a lipid-A szerkezet megváltozását jelzi a natív LPS készítményekhez képest. Korábban publikálták, hogy a poliszacharid lánc hossza is

magyarázhatja az LPS gyulladáshoz vezető aktivitásának különbözőségét az eltérő fajokban, ugyanis az *E. coli* LPS-e, amelyet hosszú poliszacharid lánc jellemez, gyengébb gyulladáskeltő (IL-6, TNF) és gyulladáscsökkentő (IL-10) citokin válaszokat generál, mint a rövidebb poliszacharid láncú LPS-e. Kísérleteinkkel igazoltuk azt is, hogy az endotoxin sugárzással detoxifikált formája is képes volt reagálni a TLR4-gyel és megtartotta kötődési képességét és specifikusságát erre a receptorra.

Fontos megjegyezni, hogy kísérleti rendszerünkben mind az RD-LPS, mind az N-LPS képes volt endotoxin toleranciát indukálni, mivel mindkettő gátolta az IL-12 és az IL-1 $\beta$  gyulladáskeltő citokinek termelését az ismételt LPS kezelések után. Az a tény, hogy a nem toxikus RD-LPS megőrizte az endotoxin tolerancia kiváltásának képességét, a méregtelenített LPS előnyös tulajdonságának tekinthető. Ugyanis korábban például leírták, hogy az endotoxin tolerancia kialakulása a szervezetben döntő tényező lehet az allergiás légúti gyulladások enyhítésében. Az endotoxin-tolerált sejtek mellett, hogy másodlagos stimuláció esetén kevesebb gyulladáskeltő mediátort szekretálnak, magasabb gyulladáscsökkentő citokin szinteket is eredményeznek, mint például magasabb IL-10 és transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ) szinteket. Rendszerünkben azonban sem a natív, sem a sugárzással méregtelenített LPS nem eredményezett megnövekedett IL-10 szintet az endotoxin-tolerált moDS-ekben az egyetlen LPS dózissal kezelt sejtekhez képest. A megfigyelt különbség valószínűleg az LPS molekulák heterogenitásának köszönhető, mivel az LPS fajtája és az, hogy milyen baktériumfajból származik nagymértékben befolyásolhatja az immunválasz minőségét.

Az ELISPOT méréseinkből származó adataink azt mutatták, hogy a humán moDS-ek RD-LPS-sel történő kezelése nagyobb potenciállal indukálja az IFN- $\gamma$ -termelő Th1 sejtek polarizációját a ko-kultúrákban, mint az N-LPS. Mivel intracelluláris ROS termelésben és fenotípusos érésben nem volt különbség az N-LPS és RD-LPS hatásai között, valószínűsítjük, hogy az eltérő Th1 indukáló hatás mögött a citokin termelés indukálásában tapasztalt különbségek állhatnak. Ugyanis az N-LPS kezelés szignifikánsan magasabb IL-1 $\beta$  és IL-10 citokin szinteket eredményezett az RD-LPS-hez képest. Korábban megfigyelték, hogy az IL-1 $\beta$  hatással van a Th2 differenciálódásra, a CD4<sup>+</sup> T-sejtek tenyésztése Th2 polarizáló körülmények és IL-1 $\beta$  jelenlétében az IL-13 termelés jelentős növekedését eredményezték az IL-1 $\beta$  nélkül tenyésztett sejtekhez képest. Így valószínűleg a DS-ekből származó IL-1 $\beta$  kedvezhet a Th2 irányú

polarizációnak, ami a Th1 irányt háttérbe szorítja. Az IL-10-et eredetileg a Th2 sejtek által termelt citokinnek írták le, mely rendelkezik azzal a képességgel, hogy a Th1 sejtek citokin termelését elnyomja, viszont később kiderült, hogy aktivált DS-ek is termelik. Eredményeink azt sugallják, hogy az N-LPS IL-10 indukáló hatása a moDS-ekben kifejezettebb volt, mint az RD-LPS kezelések esetében, így az N-LPS-sel kezelt DS-ek alacsonyabb Th1 polarizáló kapacitása a magasabb IL-10 szint miatt alakulhatott ki. Megemlítendő, hogy az IL-10-et, IFN- $\gamma$ -t korlátozó és a Th2 sejteket támogató citokineként említik többféle Th2 típusú gyulladásban is, különböző *in vivo* egérmodellekben. Feltételeztük továbbá, hogy az RD-LPS-nek kitett moDS-ek IL-10 termelését befolyásolhatták az endotoxin ionizáló sugárzása által generált szabad zsírsavak is, mivel vizsgálataink szerint a  $\beta$ -hidroximirisztinsav koncentrációja háromszor magasabb volt az RD-LPS készítményekben, mint az N-LPS-ben. Széles körben elfogadott, hogy a szabad zsírsavak immunmoduláló tulajdonságokkal rendelkeznek, és befolyásolják az immunválaszok kimenetelét a szervezetben. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy az LPS-sel kezelt moDS-ek IL-10 termelése gátolható mirisztinsav jelenlétében. Így arra a következtetésre jutottunk, hogy az RD-LPS készítmények magasabb mirisztinsav tartalma hozzájárulhatott az RD-LPS-nek kitett moDS-ek alacsonyabb IL-10 termeléséhez. Az alacsonyabb IL-10 szint miatt az RD-LPS-nek kitett moDS-ek nagyobb mértékben voltak képesek indukálni az IFN- $\gamma$ -t termelő Th1 sejteket a ko-kultúrákban, szemben az LPS natív formájával kezelt DS-ekkel. *In vivo* kísérleti rendszerünkben az RD-LPS-sel végzett hosszan tartó előkezelés (70 nap) képes volt jelentősen csökkenteni a parlagfű pollen által kiváltott légúti eozinofiliát hathetes BALB/c egerekben. Kísérleteinkben újszerű módon az LPS-t aeroszol formájában alkalmaztuk az allergén expozíció előtt, amely lehetővé tette az endotoxin eloszlását a laboratóriumi állatok környezetében, beleértve az almot, az ételt és az italt. Ez a technika segített abban, hogy jobban elősegítsük a környezet renaturációját és modellezzük azokat a körülményeket, amit az állattartó gazdaságok környezete jellemez, ahol az LPS szintek jelentősen magasabbak, mint a belvárosi otthonokban. Így az egerek endotoxin expozíciója nemcsak belégzéssel, hanem szájon át is megtörténik. Mind a belégzéssel, mind a szájon át történő endotoxin kezeléssel megállapították, hogy hozzájárul az atópia megelőzéséhez.

Eredményeink arra utalnak, hogy a natív LPS-hez képest, az RD-LPS nagyobb Th1 sejt polarizáló képessége elősegítheti a Th2-típusú gyulladás Th1 irányba történő eltolódását, ami gátolja a Th2 mediált allergiás folyamatok kialakulását. Így feltételezzük, hogy az RD-LPS rendszeres aeroszol formájában történő alkalmazása hozzájárulhatna a városi környezet renaturálásához és ezáltal csökkenthetné az allergiás megbetegedések kialakulásának esélyét. Azonban fontos megjegyezni, hogy az RD-LPS kezelés csak az első életévben lehet hatásos, amikor a külső mikrobiális ingerekre való fogékonyság még fennáll.

## VII. Összefoglalás

Munkánk során elsőként a rapamycin emlős célpontjának (mTOR) endogén szabályozó szerepét kívántuk feltárni a humán monocita-eredetű DS-ek (moDS-ek) és plazmacitoid DS-ek (pDS-ek) retinsav-indukálható gén (RIG) I-szerű receptorok (RLR) által kiváltott effektor funkcióiban. Eredményeink azt mutatják, hogy az RLR stimuláció megnövelte az mTOR komplexek (mTORC1, mTORC2) downstream célpontjainak, a p70S6 kináznak, illetve az Akt-nak a foszforilációját, amit az mTORC1 inhibitor, a rapamycin, valamint a kettős mTORC1/C2 kináz inhibitor, az AZD8055 mindkét DS altípusban gátolt. Továbbá az mTOR gátlása az moDS-ekben gátolta az RLR stimuláció által kiváltott glikolitikus tranzíciót is. Az mTOR blokkolása csökkentette az RLR-stimulált moDS-ek és pDS-ek I-es típusú interferon (IFN) és pro-inflammatorikus citokin termelő képességét, míg a DS-ek fenotípusát nem befolyásolta. Emellett a rapamycin gátolta mindkét DS altípus IFN- $\gamma$  és granzim B termelő CD8<sup>+</sup> T-sejt proliferációját és differenciálódását indukáló képességét, amire az AZD8055 nem volt képes. Így megállapítottuk, hogy az mTOR pozitívan szabályozza a humán DS-ek RLR által közvetített vírusellenes aktivitását, továbbá rávilágítottunk az mTORC1 szelektív és a kettős mTORC1/C2 gátlás különbségeire. Ezt követően a környezetben található endotoxinok immunmoduláló hatását vizsgáltuk DS-eken. Kíváncsiak voltunk, hogy a beltéri környezet aeroszolizált, sugárzással méregtelenített lipopoliszachariddal (RD-LPS) történő renaturálása megelőzheti-e a parlagfű okozta Th2-típusú légúti gyulladás kialakulását. Elsőként *in vitro* kísérleteinkben kimutattuk, hogy az RD-LPS-nek kitett moDS-ek nagyobb Th1-polarizáló képességgel rendelkeznek, mint az N-LPS-nek kitett moDS-ek. *In vivo* kísérletek során hathetes BALB/c egerek ketreceit naponta kezeltük aeroszolizált N-LPS-sel vagy RD-LPS-sel. Tíz hetes kezelési időszak után az egereket szenzibilizáltuk és parlagfűpollen-kivonattal provokáltuk az allergiás gyulladást. Az előzetesen RD-LPS-ben gazdag milióban élő egereknél szignifikánsan kisebb allergiás légúti gyulladás alakult ki, mint az N-LPS-ben gazdag vagy az LPS kezelés nélküli környezetben élő egereknél. Így feltételezhető, hogy korai életkorban a városi beltéri környezet renaturálása aeroszolizált, nem toxikus RD-LPS-sel alkalmas lehet a Th2-mediált allergiák megelőzésére.



Nyilvántartási szám: DEENK/376/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ágics Beatrix

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10076937

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Bácsi, A.\* **Ágics, B.\***, Pázmándi, K. L., Kocsis, B., Sándor, V., Bertók, L., Bruckner, G., Sipka, S.:  
Radiation-Detoxified Form of Endotoxin Effectively Activates Th1 Responses and Attenuates  
Ragweed-Induced Th2-Type Airway Inflammation in Mice.  
*Int. J. Mol. Sci.* 25 (3), 1-22, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25031581>  
\* Megosztott első szerzős közlemény.  
IF: 5.6 (2022)
2. 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





### További közlemények

3. Pázmándi, K. L., **Ágics, B.**, Szöllösi, A. G., Bácsi, A., Fekete, T.: Ginger-derived bioactive compounds attenuate the Toll-like receptor mediated responses of human dendritic cells. *Eur. J. Pharmacol.* 967, 1-16, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176399>  
IF: 5 (2022)
4. Bencze, D., Fekete, T., **Ágics, B.**, Pázmándi, K. L.: A vírusok ellenségei: a humán plazmacitoid dendritikus sejtek. *Immunol. Szle.* 12 (2), 4-20, 2020.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,161**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
13,161**

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

Debrecen, 2024.06.20.



## **IX. Kulcsszavak**

Dendritikus sejt, plazmacitoid dendritikus sejt, monocita-eredetű dendritikus sejt, TLR, RLR, mTOR, RIG-I, MDA5, antivirális válasz, I-es típusú interferon, gyulladáso válasz, parlagfű, allergia, lipopoliszacharid (LPS), sugárzással méregtelenített LPS (RD-LPS), BALB/c egér.

## **XI. Köszönetnyilvánítás**

Hálás köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Pázmándi Kitti Lindának, akinek kiemelkedő szakmai iránymutatása, segítsége és támogatása tette lehetővé, hogy ez az értekezés létrejöjjön. Köszönetemet fejezem ki Dr. Fekete Tündének, aki szakmai felkészülésemhez és a kísérletek tervezéséhez és megvalósításához nyújtott nagy segítséget. Köszönöm Berki-Pál Angélának a támogatását, mellyel laboratóriumi munkámat segítette. Köszönöm Dr. Bencze Dórának a példamutatását és biztatását. Szeretnék továbbá köszönetet mondani Prof. Dr. Bácsi Attilának, aki lehetőséget biztosított arra, hogy PhD tanulmányaimat és az értekezésemhez szükséges kísérleteket az Immunológiai Intézetben végezhessen.

Továbbá köszönettel tartozom Prof. Dr. Sipka Sándornak és Prof. Dr. Bruckner Gézának, akik az RD-LPS hatásait széleskörűen tanulmányozták és a közlemény megszületéséhez nélkülözhetetlen szakmai megalapozást nyújtottak.

Külön köszönet illeti Prof. Dr. Kocsis Bélát és Dr. Sándor Viktort, akik nagy segítségünkre voltak a kísérletek során az LPS-kivonatok tömegspektrometriás analízise révén.

Köszönöm édesanyám, családom, barátaim támogatását, akik az évek során mindig mellettem álltak. Külön köszönöm nagymamám mérhetetlen segítségét, mellyel végigkísérte tanulmányaimat.

A dolgozat Prof. Dr. Bertók Lóránd emlékéét őrzi, aki az „RD-LPS atyja” volt.