

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**MINTÁZATFELISMERÉS ÉS A TERMÉSZETES IMMUNITÁSHOZ KÖTŐDŐ
JELÁTVITELI FOLYAMATOK HUMÁN DENDRITIKUS SEJTEKBEN**

Szabó Attila

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Debrecen, 2012

MINTÁZATFELISMERÉS ÉS A TERMÉSZETES IMMUNITÁSHOZ KÖTŐDŐ JELÁTVITELI FOLYAMATOK HUMÁN DENDRITIKUS SEJTEKBEN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:

Szabó Attila

okleveles biológus, filozófia szakos bölcész

Készült a

Debreceni Egyetem

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia

doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

tagok: Dr. Buzás Edit, az MTA doktora

Dr. Bay Péter, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2013. február 4.

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sandra Gessani, Ph.D.

Dr. Kónya József, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Maródi László, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Sandra Gessani, Ph.D.

Dr. Kónya József, Ph.D.

Dr. Buzás Edit, az MTA doktora

Dr. Bay Péter, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. február 4. 13:00

Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi
Centrum, Belgyógyászati Intézet, „A” épület tanterme

1. Bevezetés

A Dendritikus sejtek (DS) a hematopoetikus sejtek egy olyan csoportja, melyek evolúciósan együtt fejlődtek az adaptív immunrendszer elemeivel. A DS-ek hatékony “karmesterei” a veleszületett és adaptív immunválasz összehangolásának, mely során képesek érzékelni, internalizálni, és prezentálni a környezeti antigénekből származó peptid fragmentumokat a T-limfocitáknak. Ismert, hogy aktivitásuk kritikus mind az immunválasz indukciója, mind pedig az immunológiai tolerancia felntartása szempontjából. A 2011-es orvostudományi Nobel-díjat a veleszületett (“természetes”) immunitás érzékelési folyamatainak azonosításáért és azoknak a modern orvosi kutatásokra gyakorolt hatásáért ítelték oda Bruce Beutler-nek, Jules Hoffmann-nak és Ralph Steinman-nak. A díjat megosztva adták oda a Toll-like receptorok (TLR) ecetmuslicák immunválaszában betöltött szerepének, és az emlős TLR-ek DS-ek aktiválásában játszott szerepének felfedezéséért. A membránkötött TLR-ek és a citoplazmatikus RIG-I-szerű receptorok (RLRs) a veleszületett érzékelők két fontos családja. Mindkét típusú receptor aktiválása a pro-inflammatorikus és interferon válaszok elindításához vezet, melyek két kulcsfontosságú ágai a korai fázisú immunvédelemnek. Az elmúlt évtized új vakcinációs stratégiái az ilyen receptorok specifikus aktivációját vagy kostimulációját célozzák a vírusfertőzések elleni immunválasz hatékonyságának növelése érdekében.

Munkánk célja a TLR-ek és RLR-ek tanulmányozása és funkcionális aktivitásának vizsgálata volt emberi DS alpopulációkban, különféle körülmények – pl. akut vagy krónikus gyulladás és vírusfertőzés – között. Létrehoztunk továbbá egy humán DS *in vitro* modellt, egy vakcina komponens adjuváns hatásának, és pontos hatásmechanizmusának vizsgálata érdekében.

1.1 Dendritikus sejt altípusok és funkcióik

A DS-ek azonosítása és antigén-prezentáló képességük funkcionális jellemzése (Steinman és Cohn) az immunológia történetének fontos mérföldköve volt 1972-ben. Az a megállapítás, hogy az epidermális Langerhans sejteket (LS) funkcionálisan megegyeznek a lép dendritikus sejtjeivel, vezetett az egységes DS egyedfejlődési model megalkotásához. A DS-ek a hematopoietikus rendszer tagjai, és viszonylag rövid *in vivo* életidővel rendelkeznek mind egérben, mind pedig emberben. A szöveti lokalizáció és funkcionális tulajdonságok

alapján az emberi DS-eket két fő típusba sorolhatjuk: hagyományos DS (konvencionális DS, kDS) és plazmacitoid dendritikus sejtek (pDS). Mivel a kDS-ek és pDS-ek a perifériás szövetekben nem-osztódó sejtek, folyamatosan pótlódnuk kell csontvelői eredetű hematopoetikus őssejtek (HSC-k) által. A legtöbb emberi DS – mint például a LS, intersticiális (bőrön át vagy szövet) DS és monocita eredetű dendritikus (moDS) – myeloid prekursorokból származik.

Patogén invázió vagy gyulladás során a DS-ek aktiválódnak, és érési folyamaton esnek át, melynek során megváltozik kemokinreceptor expressziójuk. Ez a folyamat biztosítja az aktiválódott DS-ek gyors migrációját a nyirokereken át a nyirokcsomókba. Itt az aktivált dendritikus sejtek felhalmozott antigén tartalmukat prezentálják a rezidens T limfocitáknak, melyek az aktivációt követően effektor és memória sejtekké differenciálódnak. A mikrobiális eredetű anyagok erős aktivátorai a nyugvó DS-eknek és stimuláló jeleket közvetítenek az evolúciósan erősen konzervált mintázatfelismerő receptorok (PRR) számára. Válaszként ezekre a stimulusokra a szöveti rezidens DS-ek a gyulladt szövetekbe migrálnak onnan antigéneket szállítanak a másodlagos lymphoid szervekbe, ahol megindítják az adaptív immunválaszt kiváltó naív T sejtek aktivációját. Ugyanakkor, monociták is érkeznek a gyulladt szövetek és fagocitáló antigénprezentáló sejtekké (“Antigen-Presenting Cells”, APC-k, pl. DS) differenciálódva ellensúlyozzák a DS-ek gyors kijutását. Az újonnan differenciálódott moDS-ek működhetnek szöveti rezidens APC-ként vagy termelhetnek gyulladási citokineket. Ezen túlmenően, ezek a sejtek a perifériás limfoid szervekbe is vándorolnak és ott naív T-limfocitákat aktiválnak.

Emberi CD1 molekulák családjába olyan felszíni glikoproteinek tartoznak, melyek megtalálhatóak a timociták, epidermális LS-ek, és némely B-sejt alpopuláció tagjainak felszínén. A család négy homológ fehérjéből áll (CD1a, CD1b, CD1c és CD1d), valamint a CD1 gén lókuszt az emberi 1-es kromoszómán öt lehetséges CD1 gént tartalmaz. A CD1 membránefehérjék fő funkciója, hogy a T-limfociták egy csoportjának (CD1-restricted T cells) saját- vagy kórokozó eredetű lipideket prezentáljanak. Az MHC II molekulákkal ellentétben a CD1a membrán-expressziója nem függ a DS-ek érési folyamataitól, de keveset tudunk ennek a folyamatnak a transzkripció és/vagy ligandum-függő szabályozásáról. Csoportunk korábban azonosított két olyan emberi moDS alpopulációt, melyek fenotípusos és funkcionális jellemzőik alapján eltérőek voltak. A $CD14^{low}DC-SIGN^{+}PPAR\gamma^{high}CD1a^{-}$ moDS alcsoportot (a továbbiakban CD1a⁻DS) már azonosították nyirokcsomókban; jellemzőjük, hogy hatékonyan fagocitálnak baktériumokat és apoptotikus sejteket. A környezeti stimulusoktól függően ezek a sejtek $CD14^{+}DC-SIGN^{+}PPAR\gamma^{low}CD1a^{+}$ gyulladási sejtekké

differenciálódhatnak, melyekre jellemző a magas citokinszekréció és a CD40 és E-cadherin membránexpressziója. A CD1a⁺ DS alcsoport kimutatható a reaktív nyirokcsomók interfollicularis területein. A CD1a⁻/CD1a⁺ moDS arány egyénenként változik, és azt negatív irányban szabályozzák a különféle szérum lipidek és szintetikus PPAR γ ligandumok, amelyekről kimutatták, hogy fokozzák magas patogenitású influenzavírus fertőzés kórlefolyásának súlyosságát egerben.

Az *in vitro* létrehozott emberi moDS alcsoportok különféle környezeti stimulusokra mutatott figyelemre méltó plaszticitása ígéretes jelöltté teszi ezeket a sejteket a rák és vírusok elleni terápiák fejlesztéséhez.

1.2 A természetes immunitás mintázatfelismerési folyamatai dendritikus sejtekben – a TLR és RLR családok szerepe különféle körülmények között

A DS-ek a PRR-ek széles skáláját fejezik ki, amelyek különféle sejtalkotókban találhatóak meg. A PRR-ek sejt-specifikus expressziója és intracelluláris kompartmentalizációja alapvetően meghatározza ezen receptorok szinergikus vagy gátló kölcsönhatásait, illetve a kapcsolódó jelátviteli útvonalakat és effektor mechanizmusokat. Az immunológia történetének egyik fontos eseménye a *Drosophila* Toll fehérjéjének leírása volt, amely alapvető fontosságú az *Aspergillus fumigatus* elleni immunválaszban. A TLR család a PRR-ek egyik fontos osztálya, amelyeken keresztül a veleszületett immunrendszer észleli az invazív mikroorganizmusokat. A TLR-ek az immunválasz késői fázisában is fontosak, főleg a fagociták fertőzött szöveti területekre történő migrációjában. Újabb vizsgálatok kimutatták, hogy a TLR-ek számos mikroorganizmust (baktériumok, gombák, protozoonok, vírusok) felismernek. Aktivációt követően a TLR-ek több különféle szignáltranszdukciós kaskád-folyamatot indítanak el, melyek által az immunválaszban fontos transzkripciós faktorokat és kinázokat (NF- κ B, IRF-ek, p38, ERK1/2, JNK, stb.) szabályoznak. Ez a folyamat közös gének kifejeződését eredményezi, amelyek termékei, mint például a citokinek, kemokinek, és kostimulációs molekulák, elengedhetetlenek a veleszületett és az adaptív immunitás összehangolásában.

A MyD88 volt az első azonosított adapter fehérje, amely alapvető fontosságúnak bizonyult a TLR-jelátvitelben. A MyD88-t korábban már azonosították differenciált myeloid szövetekben, valamint az ismert volt róla, hogy kifejeződése indukálható myeloid prekurzorokban, ha azok IL-6 jelenlétében fejlődnek. Később megállapították, hogy ez a fehérje kritikus fontosságú számos receptor (TLR és IL-1R) jelátviteli folyamataiban.

Általában véve a MyD88 képes valamennyi TLR szignáltranszdukciójának közvetítésére (kivételek a TLR3, és bizonyos mértékig a TLR4). A TLR MyD88-függő jelátviteli folyamatai nagyon hasonlítanak IL-1RI sejtmag felé tartó jelátviteli. A TLR aktivációt a MyD88-nak az interleukin-1-receptor-asszociált kinázokhoz (IRAK-ok) való kötődése követi. Kezdetben úgy tűnt, hogy az IRAK-1 az IL-1RI jelátvitelében játszik fontos szerepet, mivel az IRAK-1 overexpressziója az IL-1RI-hez kapcsolódó útvonalak aktiválódásához vezet, illetve az IRAK-1-deficiens HEK293 sejtek nem reagáltak az IL-1 citokin kezelésre. A TLR aktiválás után az IRAK-1 foszforilálódik, disszociál a receptor komplexről és kötődik a TRAF6-hoz, mely a későbbi faktorok aktiválásának (pl. NF-kB és MAPK-k) fontos eleme.

Az NF-kB-n és MAPK-kon kívül a MyD88-függő jelátviteli útvonal stimulációja egy másik útvonal, az interferon reguláló faktorok (IRF-ek) aktiválódásához is vezet. Ez a folyamat rendkívül fontos, mert ezek a faktorok szabályozzák az interferonok (IFN-ek) termelődését, melyek egy erős antivirális és rákellenes citokin család tagjai. Ezeket az IRF-ek transzkripciós faktorokként működnek, és aktiválódásuk után foszforilálódnak, majd a sejtmagba transzlokálódnak, ahol I. típusú interferonok génexpresszióját szabályozzák.

A differenciálódás során a moDS-ek csökkentik CD14, fokozzák CD1a és DC-SIGN expressziójukat, és szert tesznek a CCR7 nevű sejtfelszíni receptorra, amely képessé teszi őket a limfoid szövetekbe való migrációra. Az éretlen moDS-ek ilyen típusú differenciálódása nem valószínű, hogy előfordul a gyulladással szövetekben, ahol a fejlődő sejtek folyamatosan ki vannak téve a mikrobiális vegyületekből, gyulladással mediátorokból, és szöveti sérülésekből származó stimuláló jeleknek. Széles körben ismert az a jelenség, hogy a hosszú távú aktiválás a makrofágok és dendritikus sejtek funkcionális "kimerüléséhez" vezet. Ezért az állandó stimuláló jelek miatti folytonos aktiváció megakadályozza a gyulladással szövetekben a rezidens APC-k differenciálódását. Számos molekuláris mechanizmus szerepet játszik a makrofágok és DS-ek kimerülésében. Ezek közé tartoznak a jelátviteli komponensek fokozott vagy csökkent expressziója, az olyan oldott mediátorok termelése amelyek gátolják a DS funkciókat, és számos transzkripciós faktor megváltozott kifejeződése. Noha számos útvonal szerepet játszik makrofágok és DS-ek funkcionális kimerülésében, ezek pontos hozzájárulása a folyamathoz még nem teljesen tisztázott. Az sem tisztázott még, hogy ezek a jelpályák együttműködnek, vagy külön-külön hatnak eltérő feltételek mellett és időbeli kereteken belül, avagy több gátló mechanizmus működik egyszerre, redundáns módon.

Az RLR-ek közé három szerkezetileg homológ fehérje, a retinsav-indukált gén 1 (RIG-I), melanóma-differenciálódás-asszociált gén-5 (MDA5), és az LGP2 tartoznak, amelyek mindegyike rendelkezik egy DExD/H *helikáz* doménnel. A RIG-I és MDA5 fehérjék

– ezen domén által – RNS helikáz aktivitással is rendelkeznek, tehát képesek a kettős szálú RNS ATP-függő “szétcsavarására”. Ez az esemény önmagában azonban nem vezet jelátviteli folyamatokhoz. A RIG-I és MDA5 fehérjék N-terminális végén két CARD domén található. Ez képes egy másik fehérjével, az IPS-1-el (más néven VISA vagy Cardif) interakcióba lépni. Ez az adapter fehérje a mitokondriális membránra lokalizálódik és így érdekes módon összeköti a természetes immunitást egy, az evolúció során aerob baktériumokban megjelent organelummal. Az RLR-ek elengedhetetlenek az I. típusú IFN- és proinflammatorikus citokin válaszok elindításához vírusfertőzések esetén. A különféle vírustaxonok között azonban specificitásuk alapján “válogatnak”. Tanulmányok kimutatták, hogy RIG-I erősen specifikus RNS-vírusokra, mint például influenza A (*Orthomyxoviridae*), míg az MDA5 pl. a picornavírusokat detektálja specifikus módon. A vírusok – mint természetes RLR ligandumok – mellett azonban számos más molekulák is képesek indukálni a RIG-I és MDA5 helikázokat kísérleti körülmények között. A Poly-ribinosinic:poli-ribocytidyl-sav (polyI:C vagy pl:C) egy szintetikus dsRNS, mely úgy működik, mint egy erős, mesterséges I. típusú IFN válasz-induktor, amely szelektíven aktiválja TLR3-at és az RLR-eket. E sajátosságának oka a nukleinsav lánc hossza, nem pedig a bázisösszetétel; a kereskedelemben kapható "hosszú" pI:C-t nem észleli RIG-I. Azonban a pI:C – endonukleáz RNaseIII-általi – részleges emésztésével egy rövid, körülbelül 300 bp hosszúságú "vágott" pI:C-t kapunk, amely képes aktiválni a RIG-I-et, de nem az MDA5-öt. A méretbeli diszkrimináció mögött álló mechanizmus még nem tisztázott.

A dsRNS általi aktiválást követően a RIG-I konformációs változáson megy keresztül, mely elérhetővé teszi a receptor CARD doménjét. Ezt követi egy oligomerizációs lépés, amely a RIG-I és IPS-1 CARD doménjei közötti kölcsönhatást is magában foglalja. Az MDA5 is azonos módon szignalizál az IPS-1-en keresztül. Ez az NF- κ B és az IRF-ek későbbi aktiválásához vezet. Az elmúlt évtizedben számos tanulmány született, melyek feltárták az RLR-ek vírust érzékelő és jelző mechanizmusainak részleteit. Mostanra egyértelművé vált, hogy a RIG-I és MDA5 kritikus jelentőségűek a veleszületett antivirális védelem szempontjából. Az újabb felfedezések azonban számos jelátviteli szabályozóra, valamint egyéb PRR-kapcsolt jelátviteli folyamatokra is rávilágítottak, és a kép még bonyolultabbá vált. Az RLR útvonal szabályozásának megértése több szempontból is fontos, különösen azért, mert az RLR-ekről a közelmúltban kimutatták, hogy potenciális betegség-módosító tényezők lehetnek emberben.

Sőt, újabb vizsgálatok arra is fényt derítettek, hogy a TLR és RLR szenzorok sokkal nagyobb mértékben vesznek részt a szisztémás immun homeosztázis szabályozásában, mint

azt eredetileg gondolták. A jövő PRR-alapú terápiáinak hatékonysága nagymértékben függ a TLR-RLR receptorok jelátvitelének, illetve az ezek közötti kölcsönhatások részleteinek megértésétől.

1.3 Dendritikus sejt altípusok, mint vakcinációs célpontok

Az új, DS-alapú vakcinázási stratégiák célja, hogy a dendritikus sejtek megfelelő alpopulációjába jutassák a stimulációs jelet, mely a veleszületett immunitás azonnali, megfelelő aktiválását eredményezi. A DS-ek internalizáló receptoraik segítségével folyamatosan figyelemmel kísérik a környezetükben található oldható és részecske természetű anyagokat. Az éretlen dendritikus sejtek ideális célpontjai a vakcina tervezésnek nagy fagocita kapacitásuk miatt. Olyan egyedi mechanizmusokkal rendelkeznek, amelyek célja az antigén feldolgozása és bemutatása (APC aktivitás). A részecske-antigének, mint például az intakt mikrobák vagy termékeik, apoptotikus sejtek, mesterséges gyöngyök, vagy más szemcsés anyagok, az oltási stratégiának – és a PRR-mintázatnak – megfelelően a DS-ek eltérő intracelluláris kompartmentjeibe szállíthatóak. A mikrobák vagy mesterséges gyöngyök, melyek mind antigén struktúrákat, mind pedig TLR ligandumokat is szállítanak, fagoszóma érést indukálnak a DS-ekben, és a belőlük származó peptid szegmensek az MHC II osztályba tartozó fehérjéken keresztül bemutatásra kerülnek a sejt felületén. TLR jelek hiányában azonban a fagocitált struktúrákból (pl. nem fertőzött apoptotikus sejtekből) származó peptidok – még ha mikrobákkal együtt is lettek internalizálva – nem immunogének, mivel nem teljes az antigénfeldolgozás és a fagoszóma érés. A DS aktiválódásának módja nagymértékben meghatározza a sejt citokinprofilját, valamint azt a módot, ahogyan más sejtekkel fizikai kölcsönhatást hoz létre, ezáltal befolyással van más immunsejtek funkcionális aktivitására is. Például a megfelelő DC moduláció lehetővé teszi, hogy a úgy szabályozzuk a T-sejtek effektorfunkcióit, hogy megfelelő legyen az ellenanyag válasz nagysága, és stabil, hosszútávú immunológiai memória alakulhasson ki.

Az IC31 ® egy kétkomponensű adjuváns, mely egy mesterséges antimikrobiális kationos peptidből (KLK), és egy TLR9-stimulátor oligodezoxinukleotidból (ODN1a) áll. *In vivo* vizsgálatok során, rágcsáló modelleken már leírták, hogy az IC31 ® adjuvánsként alkalmazva – és mikobakteriális antigénnel kombinálva – Th1 és/vagy Th17 polarizáló hatással bír, és anti-mikobakteriális hatékonysága egészséges önkéntesek vakcinázása után is megjelenik. A jótékony immunológiai hatások mellett az IC31® egyedi funkcionális jellemzőit, és összetevőinek jellegzetességeit is leírták. A KLK-ról kimutatták, hogy

megkönnyíti az ODN1a felvételét és transzportját a TLR9-pozitív intracelluláris vezikulumokba; ezen tulajdonságok alapján az emberi moDS-ekben óriási hatással volt a TLR9 agonisták által kiváltott immunválaszra. A TLR9-közvetített stimuláció szoros kapcsolatban áll az I. típusú interferon-termeléshez, és korábbi tanulmányok egérmodellben már feltárták az IC31® azon képességét, hogy – STAT1 foszforilációtól függő módon – képes aktiválni a peptid-specifikus citotoxikus T-sejteket. Azonban az ebben résztvevő pontos mechanizmusokat még nem azonosították.

2. Célok

- különféle aktiváció-indukált gátló faktorok hatásainak vizsgálata a differenciáció korai szakaszában TLR4-stimuláción átesett moDS-ek citokin profiljára;
- az endotoxin-tolerancia molekuláris hátterének tanulmányozása moDS-ekben, különös tekintettel a krónikus LPS-stimulációt követő, TLR4-hez kötődő jelátviteli folyamatok részleteire;
- az RLR receptorok és jelpálya-komponenseik expressziós vizsgálata moDS-ekben, nyugvó és (különféle stimulusokat követő-) aktivált állapotban;
- annak vizsgálata, hogy az RLR-ek milyen szerepet játszanak a moDS-ek pI:C és influenza A vírus által kiváltott gyulladássos- és IFN-válaszában;
- az RLR-ek aktivitásának felmérése a CD1a⁺ és CD1a⁻ DS alpopulációkban;
- az RLR-ek funkcionális jellemzése CD1a⁺ and CD1a⁻ DS-ekben RNA-interferencia és ELISPOT módszerekkel;
- az IC31® adjuváns működési módjának vizsgálata emberi DS-ekben molekuláris és funkcionális szinteken annak megfigyelésével, hogy hogyan oszlik meg, és halmozódik fel az adjuváns emberi PBMC populációkban;
- az IC31® hatásának vizsgálata a DS-ek differenciálódására, alcsoport megoszlására, az aktiválódó transzkripciós faktorokra és kapcsolódó jelátviteli kaszkádokra, valamint a sejtek citokin-profiljára;

3. Anyagok és Módszerek

Monociták izolálása, differenciáltatása, aktiválása, és kDS-ek jellemzése áramlási citometriával

A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Svédország) sűrűség gradiens centrifugálással izoláltunk. Az egészséges donorokból nyert heparinózott, leukocita dúsított vérkészítményeket a Regionális Vérellátó Központ bocsátotta rendelkezésünkre összhangban a nemzeti transfúziós igazgatóság (Debrecen, Magyarország), az Országos Vérellátó Szolgálat, és a regionális és intézményi etikai bizottságok jóváhagyásával. A donoroktól véradás előtt írásos beleegyező nyilatkozatot kaptunk, és azok adatait az Európai Unió irányelveinek megfelelően dolgoztuk fel és tároltuk. A PBMC-eket szabványos sűrűség gradiens centrifugálással – Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) – választottuk el. A monocitákat pozitív szelekcióval, anti-CD14-mikrogyöngyöket alkalmazva izoláltuk, a gyártó utasításait követve (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország). Elválasztás után a sejtek 96-99%-a volt CD14⁺ monociták, amit áramlási citometriával ellenőriztünk. A monocitákat 12 lyukú szövettenyésztő plate-eken differenciáltattuk 2×10^6 sejt/ml sűrűségben AIMV tápfolyadékban (Invitrogen, Carlsbad, CA), amit 80 ng / ml GM-CSF-el (Molecular Gentaur Products, Brüsszel, Belgium) és 100 ng/ml IL-4-el (PeproTech EC, London, Egyesült Királyság) egészítettünk ki. A 2. napon azonos mennyiségű GM-CSF-et és IL-4-et adunk a sejttenyészetekhez.

A nyugvú és aktivált dendritikus sejtek fenotipizálását áramlási citometriával végeztük, anti-CD83, anti-CD1a antitestek (ABS), és izotípus-kontroll Ab (BD Pharmingen, San Diego, CA) segítségével. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur citométerrel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) mértük, az adatokat FlowJo szoftverrel elemeztük (FaStar, Ashland, OR). A fluoreszcens festékekkel konjugált KLK (-FITC) és ODN1a (-Cy5) felvételét 37^o C és 0^o C-on vizsgáltuk.

A dendritikus sejtek aktiválása

A bakteriális lipopoliszacharid (LPS) (Sigma, Schnellendorf, Németország), humán rekombináns IFNy (PeproTech, Rocky Hill, NJ), nagy molekulatömegű polyinosinic: policitidilsav (pl: C), CL075 és CpG2216 (InvivoGen, San Diego, CA) az ábrafeliratokban megadott koncentrációban lettek a sejtekhez adva. A tisztított, élő és inaktivált A/Brisbane/59/7 (H1N1) influenza vírust (Nemzeti Influenza Laboratórium, Magyarország)

6×10^6 PFU/ml koncentrációban használtuk 1×10^6 /ml DS kezelésére, szérumentes AIMV tápfolyadékban, 24 órán át.

24 óra DS aktiváció után, összegyűjtöttük a felülúszókat (ELISA) és sejtlizátumokat (Western blot és Q-PCR esetében 18 – 24 órás kezeléseket alkalmaztunk). A KLK (10 nmol/ml), ODN1a (0,4 nmol/ml) és IC31 (KLK + ODN1a keveréke) hasonló koncentrációkban alkalmaztuk a vizsgálatok során.

RNS-izolálás, cDNS szintézis, és QPCR

A valós idejű kvantitatív polimeráz-lánreakcióhoz (QPCR) TRIzol reagenssel (Invitrogen, Carlsbad, CA) totál RNS-t izoláltunk. 1,5-2 ug RNS-t SuperScript II RNáz-H reverz transzkriptáz kit (Invitrogen), és oligo (dT) 15 primer (Promega, Madison, WI) segítségével írtunk át cDNS-é. A QPCR vizsgálatokat gén-specifikus TaqMan assay-vel és AmpliTaq DNS polimerázzal (Applied Biosystems) végeztük, mintánként 25 ul végtérfogatban, három párhuzamos alkalmazásával. A futtatást ABI Prism 7900HT real-time PCR műszeren végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA). A normalizáláshoz 36B4 háztartás-gént használtunk. A Ct-értékeket SDS 2.1 szoftverrel határoztuk meg. Minden egyes gén a vizsgálata során konstans küszöbértékeket alkalmaztunk.

siRNS kísérletek

A gén-specifikus siRNS-csendesítési kísérleteket SilencerSelect siRNS (Applied Biosystems) transzfekcióval végeztük az *in vitro* DS-differenciálódás 3. napján, GenePulser XCell műszer (Bio-Rad, Hercules, CA) használatával. A helikáz gének csendesítését RIG-I és MDA5 siRNS keverékével végeztük, és nem-specifikus negatív kontroll siRNS-t (Applied Biosystems) használtunk negatív kontrollként. A siRNS kezelések hatékonyságát az 5. és 6. napon Q-PCR-rel és Western-blottal ellenőriztük.

Western blot

A sejteket Laemmli-pufferben lizáltunk, és a protein extraktumokat TLR3 (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság), MDA5 (Élettartam, Seattle, WA), RIG-I, I κ B- α , foszfo-I κ B- α , IRF3, foszfo-IRF3 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) és a β -aktin specifikus antitestekkel (Sigma) teszteltük, 1:1000 hígításban; a másodlagos Ab-t 1:5000 hígításban használtuk. Anti-nyúl vagy anti-egér (pI κ B- α) torna-peroxidáz-konjugált (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) Ab-t alkalmaztunk másodlagos antitestként. A jelerősítéshez és jeldetektáláshoz SuperSignal kemilumineszcenciás rendszert alkalmaztunk

(Thermo Scientific, Rockford, IL). Miután a membránokat már teszteltük a célfehérjékre, újra előhívtuk β -aktinra is.

Citokin mérések

A DS kultúrák felülúszóit 24 órával az aktivációt követően begyűjtöttük, és a termelt IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , CXCL10/IP-10 és IL-12p70 citokinek koncentrációit OptEIA kitekkel (BD Biosciences) határoztuk meg. A termelt IFN β mennyiségét Human Interferon beta ELISA kittel (Cell Sciences, Canton, MA) mértük, a gyártó által javasolt módon. Az abszorbancia (OD) értékeket Synergy HT reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) készüléssel mértük 450 nm-en.

IFN γ ELISPOT

Az aktivált DS-eket (2×10^5 sejt/lyuk) kezeletlen, naiv, autológ T-sejtekkel (10^6 sejt/lyuk) együtt inkubáltuk 5 napon át 37° C hőmérsékleten 5% CO₂ mellett, szérummentes AIMV tápfolyadékban. Phytohaemagglutinin (PHA) és Concanavalin A (ConA) aktivált T-sejteket alkalmaztunk pozitív kontrollként, kezeletlen DS+T-sejt ko-kultúrák és DS-nélküli T-sejt kultúrák szolgáltak negatív kontrollként. Az aktiválódott, citokin-szekretáló T-sejtek kimutatását avidin-torma-peroxidáz rendszerrel (NatuTec) végeztük. Az ELISPOT lemezeket ImmunoScan készülékkel (CTL Ltd., Shaker Heights, OH) elemeztük.

Immunohisztokémiai (IHC) és immunofluoreszcenciás (IF) technikák

Az emberi szövetek immunfestését formalinnal rögzített és/vagy paraffinba ágyazott sebészeti mintákon végeztük. A RIG-I és MDA5 antitesteket 1:50 hígításban használtuk (Cell Signaling és élettartam-kal). Referencia-ellenanyagként affinitás-tisztított nyúl S100 protein 1:1000, Novocastra) Ab-t használtunk. A biotin-mentes EnVision+-HRP rendszert (DAKO), és VIP-kromogént (Vector Labs, Egyesült Királyság) a gyártó utasításai szerint alkalmaztuk. Egy- és kettős immunfluoreszcens (IF) festést a korábban leírtak szerint végeztük (Gogolak és mtsai. 2007 *Blood*). A tyramide-kapcsolt vörös fluoreszcens amplifikációs kittel (tetrametil-rhodamine: TMR, TSA-Fluorescent System; PerkinElmer Life Sciences) készült szövettani képek esetén a DAPI (kék fluoreszcencia, Vector Labs) nukleáris festést használtuk a sejtmagok festésére. Dupla IF esetén az első Ab-jelölést második Ab-jelölés követte, melyet előregyártott Ab-biotinilált-(Fab')₂ komplex-el és streptavidin-FITC fluorokrómmal (zöld) végeztünk. Izotípus-illesztett IgG Ab-t (DakoCytomation) használtunk kontrollként. A mikroszkópos felvételeket Olympus BX51 mikroszkópra szerelt, gerjesztési szűrőkkel ellátott

(zöld – FITC, piros – rodamin, és kék – DAPI) DP70 digitális fényképezőgéppel (Olympus Europe, Hamburg, Németország) készítettük.

Statisztikai analízis

A bemutatott adatok a számtani középérték (mean) \pm standard deviáció (SD) alapján lettek prezentálva. A p értékeket Student t teszt alapján generáltuk. A $p < 0.05$ értékeket vettük statisztikailag szignifikánsnak; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.005$.

4. Eredmények

4.1 Az IRAK-1 szerepe a TLR4-jelátvitelben moDS-ek krónikus stimulációja során

4.1.1 Az LPS-indukált IRAK-1 leszabályozódás elegendő a moDS-ek további aktivációjának gátlásához

Több csoport leírta már, hogy a TLR4 és IRAK-1 fehérjék hosszútávú LPS stimulua hatására lebomlanak dendritikus sejtekben és makrofágokban, ugyanakkor a gátló IRAK-M fehérje szintje felregulálódik krónikus DS aktiválás során. Vizsgálataink során áramlási citometria és Western-blot segítségével összehasonlítottuk a TLR4 expresszióját 2 napig LPS jelenlétében differenciálódó moDS-ekben, és nem tapasztaltunk TLR4 expresszió csökkenést LPS jelenlétében. Ezt követően vizsgáltuk az IRAK-1 és IRAK-M fehérjék szintjeit moDS-ekben – LPS jelenlétében, vagy anélkül – és Western-blot módszerrel kimutattuk, hogy az IRAK-1 fehérje szintje jelentősen csökkent 2 nap LPS kezelést követően. Az IRAK-M szint is enyhén csökkent, mutatva, hogy az IRAK-M-nek valószínűleg nincs köze a moDS-endotoxin tolerancia mechanizmusához. Eredményeink szerint a krónikus TLR4 aktiváció-indukált IRAK-1 szint csökkenés fontos szerepet játszhat a moDS-ek funkcionális kimerülésében mivel az a jelenség önmagában csökkent citokintermeléshez vezet.

4.1.2 A TLR4 jelátvitel dominanciájának áttevődése a MyD88 útvonalról a TRIF útvonalra, krónikus LPS-kezelt moDS-ekben

Korábbi tanulmányok szerint az LPS-indukált toelrancia háttérében moDC differenciálódási fejlődési blokádnak, vagy károsodott TLR jelátvitel állhat. Ahhoz, hogy megértsük, hogyan befolyásolhatja a korai, kis dózisú, krónikus LPS aktiváció a moDS-ek

túlélési, a differenciálódási képességeit, vizsgáltuk azokat a mechanizmusokat, melyek TLR-indukált jelátviteli folyamatokban részt vesznek (MAPK, NF- κ B és IRF-3 útvonalak aktivitása). A MAPK útvonal a MyD88-függő TLR jelátvitelen keresztül különösen érintett lehet IRAK-1 leregulálódás esetén. Ezért vizsgáltuk az LPS által indukált Erk1/2 és p38-kinázok, valamint a transzkripciós faktorok CREB/ATF-1 foszforilációját, és megfigyeléseink szerint az LPS előkezelés csökkentette a p38 faktor foszforilációját LPS jelenlétében fejlődő moDS-ekben. Fordított esetben, az LPS nélkül fejlődő moDS-ek erős Erk1/2, p38 és CREB/ATF-1 foszforilációval válaszoltak LPS stimulációra. Az NF- κ B részleges aktivitását is megfigyeltük a MyD88-függő jelátvitel csökkenése ellenére, ami a MyD88-független, TRIF-függő útvonal aktivitására utal. Ezzel összhangban az IRF-3 faktor foszforilációját erősebbnek találtuk válaszul a specifikus TLR3 vagy TLR4 stimulációra. IRF-3 foszforiláció emelkedett LPS-előkezelt sejtekben és a fokozott IRF-3 aktivitást magasabb IFN β expresszió kísérte az LPS előkezelt moDS-ekben. Ehhez hasonlóan más, a pI:C indukcióra érzékeny, TRIF-függően szabályozott gének expressziója is növekedett (IFN α 1, IFN α 2 és CCL5), amikor a sejtek LPS előkezelést kaptak. Összefoglalva, eredményeink a TLR4 jelátvitel MyD88-függő útvonalának csökkenését láttuk LPS jelenlétében fejlődő moDS-ekben. A TRIF-függő útvonalak viszont működőképesekek maradtak a tartós LPS stimulációt követően is.

4.1.3 a fejlődés korai fázisában aktivált moDS-ek kemokin-receptor expressziója erősen korlátozott

Összehasonlítottuk a különféle kemokin gének (CXCL-ek és CCL-ek) expressziós szintjét LPS vagy anélkül tenyésztett moDS-ekben a második napon, és jelentős emelkedést tapasztaltunk a CCL5, CCL18, CCL19, CCL23, CCL24, CCL26, CXCL1, CXCL2 és CXCL5 gének kifejeződésében LPS jelenlétében, mely az LPS-el kezelt moDS-ek megnövekedett képességét mutatja a nyugvó és aktivált T-sejtek, valamint a granulociták vonzásában. Amellett, hogy ez hozzájárulhat más sejtek gyulladáshoz való beáramlásához, az LPS-sel kezelt moDS-ekben fokozódott a szöveti mozgékonyt elősegítő, extracelluláris mátrix rendszer elemeket hasító faktorok (MMP7, MMP9 és MMP12) mRNS szintje is. Vizsgáltuk a CCR5 és CCR7 kemokin receptorok expresszióját is, és eredményeink szerint a CCR5 expressziója csökkent válaszul LPS, HKSA, zimozán vagy kezelésekre, míg ugyanezek a stimulusok növelték a CCR7 expresszióját a sejteken. Ezek szerint az eredmények szerint az LPS jelenlétében fejlődő moDS-ek elveszítik a gyulladt szövetekből történő migrációs képességüket.

4.2 Az RLR-mediált, CD1a⁺ moDS-ek által termelt IFN β szerepe az antivirális immunitásban

4.2.1 A RIG-I és MDA5 szenzorok kifejeződése nyugvó és aktivált emberi moDS-ekben

A citoszolikus RLR család RIG-I és MDA5 helikázai hasonló dsRNS specificitással rendelkeznek, mint a membránkötött TLR3, de pontos szerepük eddig tisztázatlan. Először vizsgáltuk a RIG-I és MDA5 expresszióját nyugvó moDS-ekben és azt találtuk, hogy azok kifejezik mindkét érzékelőt, bár alacsonyabb szinten, mint a monociták, viszont expressziójuk indukálható volt ATRA, LPS, és pI:C kezelés hatására. Három független donorral kapott eredményeink szerint a helikázok mRNS szintjei korrelálnak a CD1a⁺ sejtek arányához. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a membrán TLR3 mellett, a nyugvó moDS-ek az RLR család receptorait is kifejezik, melyek expressziója indukálható különböző stimulusokkal.

4.2.2 RLR-specifikus gének expressziója moDS alpopulációkban

Annak megállapítására, hogy a RIG-I és MDA5, illetve a csatlakozó jelátviteli elemek hogyan expresszálódnak a két altípusban, szétválasztottuk a DS-eket CD1a⁺ és CD1a⁻ frakciókra, és mRNS illetve protein analízisnek vetettük alá őket. Mindkét nyugvó moDS alcsoportban kifejezte a RIG-I és MDA5, az IRF3, és az effektor citokin IFN β 1 génjeit. A CD1a⁺ sejtek azonban szignifikánsan magasabb expressziót mutattak a mind a négy gén (RIG-I, MDA5, IRF3 és IFN β 1) esetében, mint a CD1a⁻ sejtek. Továbbá, a nagy dózisu pI:C kezelés elsősorban a CD1a⁺ DS-ekben fokozta az RLR, IRF3, és IFN β 1 mRNS expressziókat. Az aktivált CD1a⁺ moDS-ek magasabb szinten expresszálták RIG-I és MDA5 fehérjéket is, mint a CD1a⁻ sejtek.

4.2.3 Az NF- κ B és IRF3 jelátviteli útvonalak aktivitása CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS-ekben

Az NF- κ B és az IRF3 - IFN β jelátviteli útvonalak aktivitási szintjének tanulmányozása érdekében összehasonlítottuk a CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS-ekben a foszforilált I κ B α és IRF3 szinteket. Mindkét útvonal aktivitása – a transzkripciós faktorok pI:C-indukált foszforilációja – sokkal erőteljesebb volt a CD1a⁺ alcsoportban. Ezzel összhangban a termelt citokin szintje is statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott (n = 9): az IL-6, TNF α , IL-12p70, CXCL10, és IFN β (p = 0,006) citokineket főképp a CD1a⁺ alcsoport termelte. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a különböző RLR expresszió és jelátviteli aktivitás miatt a

CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS alpopulációk eltérő módon vesznek részt a gyulladáshoz és interferon válaszok mediálásában.

4.2.4 RLR-mediált gyulladáshoz citokin és I típusú IFN szabályozás emberi CD1a⁺ moDS-ekben

Előzetesen kimutattuk, hogy pI:C aktiválás hatására a gyulladáshozkeltő citokinek és az I. típusú IFN β termelése elsősorban a CD1a⁺ moDS alcsoportnak tulajdonítható. Mivel a dsRNS analóg pI:C mind az RLR-ek, mind pedig a TLR3 specifikus liganduma, siRNS technológiával igyekeztünk felderíteni a fent említett citokinválaszok háttérében álló mechanizmust CD1a⁺ sejtekben. A TLR3 gén csendesítése az NF- κ B-szabályozott proinflammatorikus citokinek és kemokinek (IL-6, TNF α és CXCL10) szintjének drámai csökkenését vonta maga után, pI:C aktiválást követően. Érdekes, hogy az említett citokinek szintje nem változott jelentősen, amikor a RIG-I/MDA5 géneket reguláltuk le specifikus siRNS kezeléssel, viszont az IFN β expressziója és termelése jelentősen csökkent. Ezek az eredmények azt mutatják, a pI:C aktivációt követő IFN β választ elsősorban az RLR-ek szabályozzák, míg a TLR3 elsősorban a gyulladáshozkeltő citokinek szekrécióját irányítja emberi CD1a⁺ moDS-ekben.

4.2.5 A CD1a⁻ és CD1a⁺ moDS alpopulációk szerepe az antivirális immunválaszban

Az I-es típusú IFN β szerepe az adaptív T-sejt-válaszban jól ismert mind egérben és emberben. Az I-es típusú interferonok képesek fokozni a T-sejtek aktivitását az antigénprezentáció fokozásán keresztül, továbbá ismert az is, hogy a RIG-I erősen specifikus szenzora az influenza vírusnak *in vivo*. Mivel eredményeink azt mutatták, hogy a CD1a⁺ alpopuláció nagy mennyiségű IFN β termelésére képes, ezért feltételeztük, hogy ez az alcsoport hatékonyabb lehet a vírussal fertőzött sejtek elpusztítására "szakosodott" CD8⁺ T-sejtek aktiválásában, mint a CD1a⁻ sejtek. Annak megállapításához, hogy létezik-e ez a DS altípus-specifikus szabályozás, CD1a⁺ és CD1a⁻ sejteket aktiváltunk influenza A vírussal és összehasonlítottuk az alpopulációk naiv, autológ CD8⁺ T-sejtekre gyakorolt aktiváló képességét. Az így létrehozott DS-T-sejt ko-kultúrákban az IFN γ termelő (*ie.* aktivált) T-sejtek száma szignifikánsan nagyobb volt, ha azokat CD1a⁺ DS-ekkel raktuk össze. A RIG-I/MDA5 receptorok génspecifikus csendesítésének hatására az IFN γ -t szekretáló T-limfociták száma erősen csökkent mindkét alcsoportban bizonyítva, hogy az influenza-ellenes CD8⁺ T-sejt válasz RIG-I/MDA5-függő. Ezek az eredmények megerősítik az RLR-ek funkcionális szerepével kapcsolatos hipotézisünket, és bizonyítják, hogy a RIG-I/MDA5 jelátviteli

rendszer fontos szerepet játszik az influenza vírus-specifikus CD8⁺ T-sejt-aktiváció szabályozásában, CD1a⁺ moDS-ekben.

4.2.6 A RIG-I és MDA5 expresszió ex vivo vizsgálata humán tonsillaris és reaktív nyirokcsomó DS-ekben

A monocita-eredetű DS-eket migrációs és a gyulladáshoz vezető sejtekként azonosították, melyek megtalálhatóak a perifériás szövetekben és nyirokcsomókban. A RIG-I/MDA5 expresszáló DS szöveti előfordulásának elemzéséhez immunhisztokémiai (IHC) immunfluoreszcenciás (IF) vizsgálatokat végeztünk emberi tonsillaris- és nyugalmi vagy reaktív nyirokcsomó szövetekben. Immunperoxidáz (IP) festéssel sikerült kimutatnunk MDA5 és RIG-I expresszáló sejteket a nem-reaktív nyirokcsomók perifollicularis régióiban. S100-al, egy tipikus DS markerrel, történő kettős festéssel azt is kimutattuk, hogy a dendritikus sejtek egy része pozitív volt RIG-I-re. MDA5 és RIG-I pozitív sejteket találtunk a reaktív nyirokcsomók interfollicularis területein is, melyek jellegzetes dendritikus morfológiát mutattak. Eredményeink szerint tehát az RLR expresszáló DS-ek kimutathatóak humán limfoid szövetekben mind fiziológiás, mind pedig kóros körülmények között.

4.3 A kétkomponensű IC31® adjuváns endoszomális TLR-eken keresztül fokozza a moDS-ek IFNβ-termelését

4.3.1 Az IC31® és komponenseinek akkumulációja humán PBMC populációkban

A PRR-ek sejttípus-specifitása és celluláris kompartmentalizációja jelentős hatással van a különféle segédanyagok funkcionális aktivitására. Munkánk során – fluoreszcensen jelölt KKK és ODN1a komponensek segítségével – elsőként megpróbáltuk meghatározni, hogy az emberi PBMC mely sejttípusaiban halmozódik fel az IC31® adjuváns. Eredményeink szerint az adjuváns elsődleges célpontjai a moDS-ek voltak. Azt is megállapítottuk továbbá, hogy a CD1a⁺ és CD1a⁻ DS alcsoport között nincs jelentős különbség az IC31® és a komponensek akkumulációjában.

4.3.2 Az IC31® hatása a moDS-ek differenciációjára és aktivációjára

Az IC31® roved- és hosszútávú hatásainak ellenőrzése érdekében különféle *in vitro* rendszereket hoztunk létre a moDS-ek differenciáltására. Az első rendszerben (*A protokoll*) a differenciálódó monociták a 0. napon és a 2. napon kapták az IC31®-et vagy komponenseit. A második rendszerben (*B protokoll*) az eljárást kiterjesztettük egy további kezeléssel az 5.

napon, valamint a moDS-eket aktiváltuk LPS + IFN γ -val, vagy különféle TLR ligandumokkal, hogy gyulladási körülményeket mimikáljunk. A harmadik rendszer esetében (*C protokoll*) az IC31® és összetevőit csak az 5. napon adtuk a sejtekhez, az aktiváló stimulusokkal együtt. Amikor a monocitákat az *A protokoll* szerint differenciáltattuk, az IC31® drámaian gátolta a CD1a⁺ sejtek képződését. Ez a hatás a KLK-nak tulajdonítható, mivel az ODN1a-nak önmagában nem volt ilyen hatása. Továbbá, az IC31® a DS-ek LPS + IFN γ - indukált aktiválást is gátolta, míg az ODN1a-nál nem figyeltünk meg ilyen hatást, ami azt jelzi, hogy az IC31® képes megzavarni a moDS differenciálódást és aktiválódást, amiben a KLK komponensnek ényeges szerepe van.

4.3.3 Az IC31® befolyásolja a humán moDS-ek citokin profilját

A fentebb említett moDS differenciálódást gátló hatással összhangban az IC31® kombinációban LPS + IFN γ -val (*B protokoll* szerint) gátolta a TNF- α és IL-6 szekrécióját, de nem volt hatással a termelt IL-1 β szintekre. Megfigyeltük továbbá, hogy az IFN β szekréciója statisztikailag szignifikáns módon fokozódott, melyet az IC31® és annak KLK komponense is előidézett, míg ODN1a-nak nem volt ilyen hatása. További eredményeink azt mutatták, hogy az IC31® és KLK megszüntette (vagy *preventálta*) az I κ B- α faktor foszforilációját, miközben az IRF3 faktor foszforilációja enyhén fokozódott és elhúzódott. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az IC31® nem képes aktiválni az NF- κ B utat, viszont támogatja a I. típusú interferon választ, és ez a moduláló hatás az IC31® peptid összetevőjének, a KLK-nak tulajdonítható.

4.3.4 Az IC31® hatása a moDS-ek I típusú interferon válaszára

Figyelembe véve az adjuváns interferonra szekrécióra gyakorolt mérsékelt hatását, teszteltük, hogy az IC31® és komponenseinek milyen befolyása van a moDS-ek differenciálódási folyamataira a *B* és *C protokollok* szerint. Az I típusú IFN- és IRF gének expressziós profiljának vizsgálata megmutatta, hogy az IC31® DS differenciálódás alatti ismételt adása fokozta az I típusú IFN és IRF gének expresszióját. Ehhez hasonló – de gyengébb – hatást figyeltünk meg, ha a sejtek csak az 5. napon kapták az adjuvánst. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ha a keringő monociták (mint moDS prekursorok) IC31®-el találkoznak a vérben, akkor I típusú IFN termelés szempontjából erősebb hatással van rájuk az adjuváns, mintha azt már a teljesen differenciált moDS-ek kapják.

4.3.5 Az IC31® működési mechanizmusa az I típusú interferonok termelésében fontos PRR-ek szintjén

Az I típusú IFN választ mind citoszolikus (pl. RLR), mind pedig endoszomális receptorok (pl. TLR) közvetíthetik. Annak tesztelésére, hogy a pI:C-indukált, IC31®-által fokozott IFN β termelést melyik szenzorcsalád irányítja, génspecifikus RIG-I és MDA5 siRNS technikát alkalmaztunk. Az RLR gének csendesítése nem volt hatással az IFN β mRNS és citokin szintekre pI:C indukciót követően. Ezzel szemben a TLR3 siRNS transzfekció az IFN β válasz drámai megszűnésével járt, tehát az mRNS és citokin eredmények alapján elmondható, hogy az IC31® I. típusú IFN válasz-fokozó hatását az endoszomális TLR3 közvetíti. Ez a megfigyelés vezetett bennünket ahhoz a feltételezéshez, hogy az IC31® elsősorban az endolizoszomális membránra lokalizálódó PRR-ekkel hat kölcsön moDS-ekben. Ezt a hipotézist ellenőrizendő, vizsgáltuk a az IC31®-IFN β termelésre gyakorolt “booster” hatását TLR7/8 és TLR9 stimuláció esetén is. Hasonlóan a TLR3 célzott stimulációjához, a TLR7/8 specifikus aktiválása (CL075 liganddal) jelentősen megnövekedett IFN β termelés eredményezett, amikor a DS-eket a *B protokoll* szerint kezeltük. Érdekes módon a TLR9 CpG2216 általi aktiválása önmagában nem indukált IFN β termelést moDS-ekben, azonban ismételt IC31® vagy ODN1a (*B protokoll*) előkezelések után mérsékelt IFN β szekréciót tapasztaltunk. Így az IC31® képesek volt “funkcionálissá tenni” a TLR9-et moDS-ekben, és ez a hatás az ODN1a összetevőnek tulajdonítható. Mivel a TLR9 génexpressziót önmagában nem befolyásolta az adjuváns, feltételezzük, hogy ODN1a képes koncentrálni a CpG2216-ot az endoszomális vezikulumokban, amely végső soron a TLR9 aktiválódásához vezet.

5. Diszkusszió

A makrofágok és DS-ek TLR ligandumok általi tartós aktiválása a sejtekben erőteljes gátló mechanizmusokat indít be. Ez válaszképtelenné teszi a sejteket a további ingerekre. Számos gátló tényező háttérében TLR-aktivációt azonosítottak, de még mindig nem világos, hogy ezek a tényezők hogyan járulnak hozzá a tolerancia kialakulásához és a további aktivációval szembeni rezisztens állapothoz. Mivel a monocita prekursorokból fejlődő dendritikus sejtek a gyulladt szövetekben a fokozott mikrobiális jelenlét miatt gátló hatásnak

vannak kitéve, úgy döntöttünk, hogy tanulmányozzuk, mely gátló pályák vannak aktiválva tartós TLR4 stimuláció során moDS-ekben.

Eredményeink szerint az IRAK-1 korai, tartós TLR4 szignálok miatti leszabályozódása önmagában elegendő lehet ahhoz, hogy gátolja a TLR-ek további aktivációját, amit siRNS-indukált IRAK-1 csendesítéssel is sikerült bizonyítanunk az IL-12-szekrécióna gyakorolt gátló hatáson keresztül. Megmutattuk azt is, hogy az IRAK-1 expressziójának csökkenése redukálta a MyD88-függő jelátviteli pálya aktiválódását is, válaszul a sejtek korai LPS aktivációjára. Egyes aktiválási ingerek, beleértve a zimozán-t, HKSA-t vagy CL075-t, gátolták a CD1a kifejeződését és a CD14 marker természetes leszabályozódását a moDS differenciálódás második napján. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a korai, krónikus TLR4 aktiválás a differenciálódási állapottól függetlenül toleranciát indukál moDS-ekben.

A legújabb tanulmányok szerint a migrációs DS-ek perifériás szövetekben történő differenciálódását nagy mértékben befolyásolja, ha az aktiválási jel a monocita prekursorokat a DS-irányú elköteleződésük előtt éri. Eredményeink támogatják ezt a hipotézist azt bizonyítva, hogy a moDS prekursorok korai aktiválása gyulladással citokin és kemokin termeléshez vezet, viszont a korlátozza a sejtek migrációs képességét. A fejlődő moDS-ek korai aktiválása tehát a nyirokcsomókra korlátozza a sejtek migrációját, ezáltal korlátozva a gyulladással jelek T-limfociták felé való továbbítását.

Új, specializált funkciókkal rendelkező DS alcsoportok azonosítása nagy kihívás elé állítja a kutatókat a DS biológia területén. A gyulladással körülmények között fejlődő DS-ek támogatják a patogénekkal szembeni védelmet, amíg a normál körülmények között differenciálódó DS-ek az gyulladással folyamatok lebonyolításában és kontrolljában vesznek részt. Ez a funkcionális divergencia a DS prekursorok végső fejlődési helyének, és a PRR-ek alcsoport-specifikus és kompartmentalizáció-függő expressziójának függvénye. A nukleotid-felismerő TLR-ek korlátozott kifejeződésével szemben a hosszabb és rövidebb dsRNS-ek felismerésére specializálódott RLR-ek számos sejt típusban megtalálhatóak.

Munkánk során összehasonlítottuk az RLR-ek expresszióját és funkcionális aktivitását két, korábban karakterizált moDS alcsoportban. Annak érdekében, hogy meghatározzuk a CD1a⁺ és CD1a⁻ moDS alpopulációk RLR-mediált gyulladással citokin és I típusú interferon termelésének jellegzetességeit, *in vitro* és humán *ex vivo* kísérleti rendszereket hoztunk létre. Megmutattuk, hogy a RIG-I/MDA5, IRF3 és IFN β gének expressziója szignifikánsan magasabb a CD1a⁺ sejtekben, mint a CD1a⁻ társ populációjukban. Ezen alpopulációk specifikus ligandokkal (pl. pI:C vagy influenza vírus) történő aktiválása során azt találtuk,

hogy az RLR-elhez kötődő jelátvitel útvonalak aktivitása sokkal erősebb a CD1a⁺ alcsoportban. Ezek az eredmények összességében azt mutatják, hogy az RLR-kaszád alpopuláció-specifikus módon működik humán moDS-ekben. Azt is megmutattuk továbbá, hogy a gyulladásozó TLR3 – NF- κ B és az RLR – IFN β útvonalak eltérő módon szabályozódnak a CD1a⁺ alcsoportban. Az RLR expresszázó DS-ek immunhisztokémiai vizsgálata és jelenlétük emberi tonsillában és reaktív nyirokcsomókban a sejtek *in vivo* fontosságára mutat rá.

Azt is bebizonyítottuk, hogy az RLR – IRF3 – IFN β jelátviteli útvonal aktiválódása alapvető fontosságú a naiv, autológ CD8⁺ T-sejtek aktiválódásához influenza vírus stimuláció esetén. siRNS vizsgálataink szerint a RIG-I/MDA5 receptorok szerepe ebben a folyamatban kritikus. Mivel az emberi moDS-eket széleskörűen alkalmazzák klinikai környezetben, továbbá a DS biológia “arany standardjaiként” tartják őket számon, úgy véljük, hogy a specializált funkcióval rendelkező DS alcsoportok azonosítása fontos hatással lehet a jövő vírus- és tumorvakcináinak tervezése szempontjából.

Az IC31® adjuváns moDS-ekre gyakorolt hatását vizsgálva azt találtuk, hogy 1) az IC31® hatékonyan felhalmozódik emberi vér-eredetű monocitákban és moDS-ekben; 2) IC31® jelenlétében a gyulladásozó CD1a⁺ moDS alpopuláció differenciálódása gátolt volt, továbbá a TNF- α és IL-6 gyulladásozó citokinek szintje csökkent, míg az I típusú IFN β szekréciója fokozódott; 3) az IC31® hosszú távon gátolta az I κ B- α foszforilációját, de elnyújtotta és erősített az IRF3 transzkripciósozó faktor foszforilációját; 4) az IC31® adjuváns erősítette a vezikuláris TLR-mediálta IFN β termelődést.

Az IC31® I típusú interferon és NF- κ B-mediálta gyulladásozó citokinek termelésére gyakorolt hatásának vizsgálata megmutatta, hogy az adjuváns, és KKK komponense exkluzíve a vezikuláris rendszer TLR-jeit célozza. Ez a hatás a KKK-nak tulajdonítható, mely feltehetőleg fokozza a TLR ligandok endovezikuláris transzportját és akkumulációját. Bár a TLR útvonalak interferálhatnak egymással, eredményeink azt mutatják, hogy az IC31® szinergisztikusan hat a TLR-indukált interferon válaszra. A TLR aktiváció kritikus lépés a DS-ek antigénprezentációsozó folyamata során, mely végül hatékony T-sejt válaszhoz vezethet. Mivel a DS-ek I típusú interferon termelése IC31® és TLR-ligandok együttes adását követően jelentősen fokozódik, feltételezzük, hogy ez a fajta erősített interferon válasz nagyban hozzájárul a sejtek T-sejt aktiváló képességének fokozásához. Az IC31®-et tehát olyan effektív adjuvánsként azonosítottuk, mely adjuváns hatását az endoszomális rendszer TLR-jein keresztül fejti ki, ezáltal hatékony eszköz lehet a jövő vírus- és tumorvakcináinak fejlesztése szempontjából.

6. Összefoglalás

A veleszületett immunitás a behatoló kórokozókkal és a szervezetben képződő káros anyagokkal szembeni védelem filogenetikailag legősibb formája. Működését az **idegen és saját**, valamint az **ártalmatlan és veszélyes** molekulák *felismerése*, a védelmi reakciót kiváltó *jeltovábbítás* és a *végrehajtó sejtek összehangolt mozgósítása* biztosítja. A veleszületett immunitás fontos résztvevői az ezeket a feladatokat ellátni képes dendritikus sejtek (DS), melyek folyamatos “őrszemként” működve biztosítják a többsejtű szervezetek immunológiai felügyeletét és a megfelelően szabályozott válaszfolyamatok elindítását. A hivatásos antigen bemutató sejtek (APS), köztük a monociták, makrofágok és DS-ek kiemelt szerepet játszanak a védelmi mechanizmusok szabályozásában és koordinálásában. Munkánk során a DS-ek által kifejezett Toll-szerű és a RIG-szerű mintázatfelismerő receptorok (TLR és RLR) szerepét tanulmányoztuk emberi DS populációk gyulladásos és I. típusú interferon válaszában szabályozásában. Az két komponensű IC31® adjuváns szerepét emberi fehérvérsejtekben és monocita eredetű DS-ekben tanulmányoztuk.

Kimutattuk, hogy

- a TLR4-közvetítette, LPS által kiváltott IRAK1 kifejeződés csökkenése önmagában elegendő a moDS-ek funkcióinak tartós gátlásához;
- a sejtaktiváció által kiváltott negatív visszacsatolási mechanizmusokat elemezve kimutattuk, hogy csak a fejlődő és még nem véglegesen differenciált moDS-ek esetében a korai TLR4 receptoron keresztüli aktiválás a gyulladáskeltő citokinek átmeneti és korlátozott megjelenését váltja ki, ami a végrehajtó funkciók szabályozott csökkenéséhez vezet, és a szövetközi vándorlásra nem képes állapot megőrzése követ;
- eredményeink szerint az RLR gének és fehérjék, valamint a kapcsolódó jelátviteli útvonalak elemeinek kifejeződése szignifikánsan magasabb a CD1a⁺ DS-ekben, mint a fenotípusos tulajdonságaik és funkcionális aktivitásuk alapján is különböző CD1a⁻ altípusban;
- a RIG-I és MDA5 gének csendesítésével végzett kísérleteink az RLR-ok által közvetített jelátvitel fontosságát igazolták a CD1a⁺ DS-ek általi naïve CD8⁺ T-sejtek aktiválásában;
- kísérleti eredményeink az RLR rendszer DS altípus-specifikus működését igazolták, és feltárták az ennek hátterében álló molekuláris mechanizmusokat,

a CD1a⁺ DS-eket egyedi funkciókkal rendelkező, gyulladásos sejttypusként azonosítottuk;

- azt is bebizonyítottuk, hogy a vándorló képességgel rendelkező CD1a⁺ DS-ek emberi nyirokszövetekben is kimutathatóak;
- a két komponensű IC31® adjuváns a vérben keringő monocitákban, MHC-II⁺ sejtekben és moDS-ekben halmozódik fel;
- az IC31® jelenlétében differenciálódó DS-ekben gátolt a CD1a⁺ sejttypus differenciációja, a gyulladásos citokinek szekréciója, miközben a sejtek IFNβ termelése fokozódik;
- az IC31® adjuváns olyan – a DS-ek funkcionális sajátosságait módosító – oltóanyag komponensként azonosítottuk, amely az NF-κB és IRF3 jelátviteli útvonalak egyensúlyának befolyásolásával révén moDS-ekben fokozza az IFNβ citokin termelését, miközben az NF-κB jelpálya és a gyulladáskeltő citokinek megjelenése gátolt;
- azt is igazoltuk, hogy az IFNβ termelést fokozó aktivitás a moDS-ek sejten belüli vezikuláris rendszerében halmozódó TLR-okon keresztül valósul meg.

Kutatási eredményeink a membránhoz kötött és a citoplazmában elhelyezkedő mintázatfelismerő receptorok közti funkcionális munkamegosztás jelentőségére hívják fel a figyelmet. Ennek gyakorlati jelentőségét a DS altípusok funkcióinak célzott módosítási lehetőségei és a sejtes immunválasz irányított szabályozása jelenti, aminek nagy jelentősége van a DS-ek megelőző és terápiás célú gyakorlati felhasználásában.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/302/2012.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Szabó Attila

Neptun kód: LLZ5H0

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

*1. Fekete, T., **Szabó, A.**, Beltrame, L., Vivar, N., Pivarcsi, A., Lányi, Á., Cavalieri, D., Rajnavölgyi, É., Réthi, B.: Constraints for monocyte-derived dendritic cell functions under inflammatory conditions.

Eur. J. Immunol. 42 (2), 458-469, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141924>

IF:5.103 (2011)

2. **Szabó, A.**, Bene, K., Gogolák, P., Réthi, B., Lányi, Á., Jankovics, I., Dezső, B., Rajnavölgyi, É.: RLR-mediated production of interferon-beta by a human dendritic cell subset and its role in virus-specific immunity.

J. Leukoc. Biol. 92 (1), 159-169, 2012.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0711360>

IF:4.992 (2011)



*A közlemény kettős felhasználású, megosztott első szerzős közlemény. Készült nyilatkozat a részleges felhasználásról, melynek dátuma: 2012.május 22.

További Közlemények

3. Szabó, A., Osman, R.M., Bacskai, I., Kumar, B.V., Agod, Z., Lányi, Á., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É.:
Temporally designed treatment of melanoma cells by ATRA and polyI.
Melanoma Res. 22 (5), 351-361, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e328357076c>
IF:2.187 (2011)

4. Benkő, S., Magyarics, Z., Szabó, A., Rajnavölgyi, É.: Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: The emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors.
Biol. Chem. 389 (5), 469-485, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2008.054>
IF:3.035

Összesített impakt faktor: 15.317

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 10.095

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2012.10.16



Szóbeli prezentációk:

Gogolak P., Benko Sz., **Szabo A.**, Rajnavolgyi E.: Dendritic cell subsets as primary targets of vaccines. *3rd Semmering Conference 2007 on Challenges for vaccine development: Medical needs and social implication, Vienna, Austria, 2007.*

Szabo A.: Type I interferon production by dendritic cells: The role of intracellular helicases. *2nd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Krompachy, Slovakia, 6.-9. January, 2009.*

Szabo A., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: The role of intracellular RIG-like helicases in the regulation of interferon responses in dendritic cell subsets. *DC Crest09 Celerina, Switzerland, 15.-20. March, 2009.*

Szabo A., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: Regulation of the interferon response in dendritic cell subsets: The role of RIG-like Helicases. *2nd European Congress of Immunology (ECI), Berlin, Germany, 13.-16. September 2009.*

Szabó A., Bene K., Gogolák P., Varga R.É., Rajnavölgyi É.: A RIG-I helikázok szerepe az interferon-válasz szabályozásában dendritikus sejt alpopulációkban. *A Magyar Immunológiai Társaság (MIT) Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, 2009. Október 29.-30.*

Rajnavölgyi É., **Szabó A.**: A mintázat felismerő mechanizmusok szerepe a természetes és szerzett immunitás együttműködésében, *A Magyar Immunológiai Társaság (MIT) Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, 2009. Október 29.-30.*

Szabo A., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: Nucleic acid sensing and signaling in dendritic cells. *3rd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Mariazell, Austria, 7.-10. January 2010.*

Szabo A., Bene K., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: Type I interferon regulation by RIG-I and MDA5 in human monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets. *9th International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens (HLDA9), Barcelona, Spain, 11.-13. March 2010.*

Gogolak P., **Szabo A.**, Rethi B., Baban D., Beltrame L., Cavalieri D., Rajnavolgyi E.: Collaboration of signaling pathways in monocyte-derived dendritic cell subsets. *DC-THERA Closing Conference 5 – 7 May 2010, Athens, Greece*

Szabo A., Varga Rita Éva, Gogolák Péter, Rajnavölgyi Éva: Collaboration of signaling pathways of the innate immune system in dendritic cells. *Membrane Transport Conference 40. 18 – 21 May 2010. Sümeg, Hungary*

Szabo A., Gogolak P., Rethi B., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: Collaboration of signaling pathways in monocyte-derived dendritic cell subsets. *DC2010: Forum on Vaccine Science, 26 – 30 September 2010, Lugano, Italy*

Szabo A., Bene K., Varga R.E., Lanyi A., Rethi B., Gogolak P., Dezso B., Rajnavolgyi E.: RIG-I/MDA5 mediated production of interferon-beta by a subset of human dendritic cells supports regulated antiviral immune responses. *Immune-related Pathologies: Understanding*

Leukocyte Signaling and Emerging therapies (IMPULSE) – 2011, Visegrád, Hungary, 3.-6. September 2011.

Szabo A., Gogolak P., Rajnavolgyi E.: Dendritic cell subset-specific expression of innate RNA sensors and their impact on microbiota-host interactions. *TORNADO WP Meeting, Stockholm, Sweden, 1.-2. September 2012.*

Szabó A., Rolah M. Osman, Bacskai Ildikó, Brahma V. Kumar, Agod Zsófia, Lányi Árpád, Gogolák Péter, Rajnavölgyi Éva: TLR3/MDA5-indukált kemokin- és interferon válasz humán melanoma sejtekben. *A Magyar Immunológiai Társaság 41. Vándorgyűlése, Debrecen, 2012. Október 17.-19.*

Poszter prezentációk:

Szabo A., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: The role of nucleotide recognizing intracellular sensors in dendritic cell signaling. *Semmelweis PhD Science Day 2009, Budapest, 30.-31. March, 2009. – 1st prize of the Molecular Medicine Section*

Szabo A., Gogolak P., Rajnavolgyi E.: The type I interferon response of human dendritic cells is mediated by RIG-I-like helicases in a functionally defined subset. *15th International FEBS Summer School on Immunology, Hvar, Croatia, 5.-12. September 2009.*

Szabo A., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: Regulation of the interferon response in dendritic cell subsets: The role of RIG-like Helicases. *2nd European Congress of Immunology (ECI), Berlin, Germany, 13.-16. September 2009.*

Magyarics Z., **Szabo A.**, Pazmandi K., Gopcsa L., Bacsi A., Rajnavolgyi E.: Cytokine production and helicase expression of leukemic plasmacytoid dendritic cells. *2nd European Congress of Immunology (ECI), Berlin, Germany, 13.-16. September 2009.*

Szabo A., Bene K., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: Contribution of RIG-I-like helicases in the type I interferon response of human monocyte-derived dendritic cell subtypes. *Virus Cell Death Conference, Stockholm, Sweden, 19.-21. november 2009.*

Szabo A., Fekete T., Beltrame L., Cavalieri D., Rajnavolgyi E., Rethi B.: Dendritic cell inactivation by chronic TLR triggering. *14th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan, 22.-27. August 2010.*

Szabo A., Bene K., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: The role of RIG-I and MDA5 in human CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell functions. *The EMBO Meeting 2010, Barcelona, Spain, 4.-7. September 2010.*

Szabo A., Bene K., Gogolak P., Varga R.E., Rajnavolgyi E.: RLH-mediated production of IFN β by a human dendritic cell subset supports regulated anti-viral immune responses. *9th Cytokines and Inflammation Conference, San Diego, CA, USA, 27.-28. January 2011.*

Bene K., Gregus A., **Szabo A.**, Debreceni Zs., Boyko N., Rajnavolgyi E.: Human monocyte-derived dendritic cell responses to commensal bacteria. *TORNADO WP Meeting 2011, Stockholm, Sweden, 11.-13. September 2011.*

Szabo A., Bene K., Gogolak P., Dezso B., Rajnavolgyi E.: Dendritic cell subsets as adjuvants of immunomodulatory vaccines. *25th Annual Meeting of the European Macrophage and Dendritic Cell Society (EMDS), Brussels, Belgium, 22.-24. September 2011.*

Szabo A., Bene K., Varga R.E., Lanyi A., Rethi B., Gogolak P., Rajnavolgyi E.: Human CD1a⁺ dendritic cells mediate efficient anti-viral immune responses via RIG-I and MDA5 signaling. *75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, 22.-25. March 2012.*

Szabo A., Osman R.M., Bacskai I., Rajnavolgyi E.: Consecutive treatment of human melanoma cells by ATRA and polyI:C results in distinct inflammatory cytokine and chemokine responses via TLR3 and MDA5. *75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award, Szeged, Hungary, 22.-25. March 2012.*

Szabo A., Osman R.M., Bacskai I., Kumar B.V., Agod Z., Lanyi A., Gogolak P., Rajnavolgyi E.: Temporally designed treatment of melanoma cells by ATRA and polyI:C results in enhanced chemokine and IFN β secretion controlled differently by TLR3 and MDA5. *3rd European Congress of Immunology (ECI), Glasgow, Scotland, 5.-8. September 2012.*

8. Tárgyszavak

Dendritikus sejt, Toll-szerű receptor, RIG-I-szerű receptor, NF- κ B, IRF3, jelátvitel, veleszületett immunitás

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Prof. Rajnavölgyi Évának folyamatos támogatását, kiváló szakmai vezetését, és azt, hogy folyamatos inspirációt jelentett számomra PhD és pre-doktori éveim alatt. Hálás vagyok, hogy magas szakmai színvonalat képviselő munkacsoportjában tanulhattam és dolgozhattam!

Köszönettel tartozom Dr. Lányi Árpádnak, Dr. Bácsi Attilának, Dr. Réthi Bencének, Dr. Benkő Szilviának, és Dr. Gogolák “Gogy” Péternek értékes tanácsaik, építő megjegyzéseik, és az Immunológiai Intézetben eltöltött évek alatti inspiráló szakmai és nem-szakmai beszélgetések miatt!

Külön köszönet illeti Nagyné Kovács Erzsikét és Veres Ágotát, akik vész esetén mindig a segítségemre siettek, borzasztóan kedvesek voltak velem, és kitűnő szakmai segítséget nyújtottak kutatómunkám során.

Köszönöm kedves barátom és kollégám, Brahma V. Kumar segítségét, amiért átnézte és szakmailag ellenőrizte ezt a disszertációt, és különösen köszönöm kedves diákjaim, Rolah M. Lønning Osman (TOK), Rafael Abulafia (TOK), Horváth Krisztián (ÁOK), Behzad Nadianmehr (TOK), és Bene Krisztián (B.Sc. és M.Sc.) szakmai segítségét, a “teadélutánokat” és a vidám perceket!

Szintén köszönet illeti az Immunológiai Intézet összes munkatársát, akik mindig egy támogató és barátságos környezetet jelentettek számomra.

És végül, de nem utolsósorban, őszintén hálás vagyok a Családomnak és az összes kedves Barátomnak, akik átsegítettek a nehéz időkön, folyamatosan mellettem álltak és mindvégig bátorítottak!