

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Az endotoxin tolerancia és a mammalian target of rapamycin
módosítja a humán dendritikus sejtek funkcióit

Fekete Tünde

Témavezető: Prof. Dr. Rajnavölgyi Éva



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2014

Az endotoxin tolerancia és a mammalian target of rapamycin módosítja a humán dendritikus sejtek funkcióit

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

Írta:

Fekete Tünde

Okleveles molekuláris biológus (mikrobiológus)

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. Sipka Sándor, az MTA doktora

Tagok: Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD

Dr. Sebestyén Anna, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

2014. december 17. 11 óra, DE ÁOK, ÉTK, Immunológiai Intézet, Diskussziós terem

Az értekezés bírálói: Prof. Dr. Sandra Gessani, PhD

Dr. Méhes Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Sipka Sándor, az MTA doktora

Tagok: Prof. Dr. Sandra Gessani, PhD

Dr. Antal-Szalmás Péter, PhD

Dr. Méhes Gábor, PhD

Dr. Sebestyén Anna, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2014. december 17. 13 óra DE ÁOK, Belgyógyászati
Intézet A épület tanterme

1. Bevezetés

A dendritikus sejtek (DC) hatásos antigén prezentáló sejtekként működnek (APC), melyek a mikrokörnyezet folyamatos érzékelése révén képesek befolyásolni mind a veleszületett, mind a szerzett immunválasz működését. A perifériás szövetekben megjelenő veszélyes saját vagy idegen anyagok felismerését követően a DC-ek aktiválódnak, majd a környező nyirokszervekbe vándorolnak, ahol specifikus T-sejt választ váltanak ki. Fiziológiai körülmények között a veszélytelen saját struktúrák folyamatos bemutatása a T-sejtek számára központi illetve perifériás toleranciát eredményez.

A DC-ek nagyfokú funkcionális plaszticitása és sokfélesége, valamint azon sajátosságuk, hogy hatékonyan képesek koordinálni a természetes és az adaptív immunrendszer működését az immunterápiás módszerek kiváló jelöltjeivé teszi őket. Terápiás célú felhasználásra nagyszámú DC állítható elő monocita illetve CD34⁺ hematopoetikus előalakokból, mely DC-ek antigénnel történő feltöltést követően tumoros vagy krónikus fertőzésben szenvedő betegekbe visszajuttatva specifikus T-sejt választ képesek indukálni. Mindemellett a tolerogén DC-ek az immunológiai tolerancia kiváltására és fenntartására alkalmazhatóak autoimmun illetve allergiás megbetegedések esetén. A terápiás célokra használt DC-ek hatékonyságának növelése azonban a DC-ek működésének mélyrehatóbb megismerését igényli.

1.1. Humán dendritikus sejt alpopulációk és szerepük az immunhomeosztázis fenntartásában

Az immunrendszer őrszemeiként működő DC-ek szórványosan szervezetünk számos pontján megtalálhatóak, mint a bőr, légutak, béltraktus nyálkahártyája vagy a keringési rendszer. Az eltérő környezeti körülmények nagyfokú funkcionális plaszticitást követelnek a DC-ektől, mely sejtek valóban változatos morfológiai, fenotípusos és funkcionális sajátossággal bíró heterogén populációt alkotnak.

A DC előalakokból származó nyugvó DC-ek két típusa a klasszikus /konvencionális (cDC) és a plazmacitoid DC (pDC). Gyulladt szöveti környezetben emellett megjelennek a monocita eredetű DC-ek (moDC), melyeket gyakran gyulladáshoz kapcsoló DC-eknek is neveznek.

A konvencionális dendritikus sejtek további két altípusa a BDCA1⁺ (CD1c⁺) DC és a BDCA3⁺ (CD141⁺) DC eltérő fagocitáló, citokintermelő és T-sejt stimuláló képességgel rendelkezik. A pDC-ek és CD1c⁺ DC-ek a vér mononukleáris sejtjeinek körülbelül 1%-át alkotják, míg a CD141⁺ DC-ek a vér mononukleáris sejtjeinek 0.1%-át teszik ki. Mindazonáltal, a nagyszámban jelenlévő szövet rezidens és migráló DC-ek mintázatfelismerő receptoraik (PRR) széles skálájának köszönhetően azonnal képesek felismerni a külső környezetből bekerülő patogéneket és hatékonyan küzdenek velük szemben.

A DC-ek kétélű kardként működnek. Az immunogén sajátosságú DC-ek a patogénekekkel szembeni erőteljes immunválasz létrehozásában fontosak, míg tolerogén társaik az immunválasz csendesítésében játszanak szerepet, ezzel gátolva az autoimmun kórképek kialakulását. Számos irodalmi hivatkozás taglalja a DC altípusok közötti munkamegosztás kulcsfontosságú szerepét az immunhomeosztázis fenntartásában; azonban ezen szabályozó mechanizmus számos aspektusa még feltárára vár.

1.2. In vitro körülmények között előállított DC-ek fenotípusos és funkcionális sajátosságai

Miután a DC-ek a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) kis százalékát alkotják könnyebben elérhető progenitorok keresése vált szükségesszerűvé. A DC-ek *in vitro* körülmények között történő előállítására eleinte CD34⁺ hematopoetikus őssejteket használtak (HSC), azonban ezen sejtek hasonlóan alacsony száma a perifériás vérben (0.1%) és csontvelőben (1%) további, nagyobb mennyiségben elérhető előalakok utáni keresésre ösztönözte a kutatókat. 1994-ben fedezték fel, hogy a vér mononukleáris sejtjeiből származó DC-ek az *in vivo* körülmények között képződő nyugvó DC-ek sajátosságaival bírnak. Azóta a monocita széles körben alkalmazott DC előalakká lépett elő. A monocitákat áltagosan 5-7 napig differenciáltatják GM-CSF és IL-4 jelenlétében, majd az így kapott éretlen DC-ek mikrobiális stimuláció vagy gyulladási citokinekkal történő aktiváció hatására érett DC-ekké alakíthatóak. Újabban számos publikáció bizonyította, hogy rövidebb differenciálódási periódus is elég működőképes DC-ek megjelenéséhez. A monocita-eredetű sejtek ugyanis már két nap után rendelkeznek az éretlen DC-ek fenotípusos és funkcionális sajátosságaival, továbbá úgy találták, hogy a 7 napos DC-ekhez hasonlóan hatékonyan képesek támogatni az antigén-specifikus T-

sejtek proliferációját és interferon- γ (IFN γ) termelését. Egy másik közlemény szerint a 3-napos DC-ek sokkal nagyobb antigén prezentáló kapacitással rendelkeznek, mint a 7-napos DC-ek, mely a DC-alapú vakcinák potenciális jelöltjeivé teszi ezen sejteket.

Az *in vitro* differenciálódás során a sejteken csökken a CD14 monocita marker kifejeződése, miközben fokozódik a DC specifikus CD1a és DC-SIGN molekulák expressziója. Ezen éretlen moDC-ek a vérben keringő primer DC-ek számos sajátosságát hordozzák, mint a migráció és az antigén felismerésében résztvevő receptorok nagyfokú kifejezése. A DC-ek érése a fagocitáló képesség elvesztésével és az érési (CD83) valamint a kostimulációs (CD80, CD86) molekulák megjelenésével jár együtt, mely fokozza a feldogozott antigének T-sejtek irányába történő prezentálását. A mikrobiális termékek mellett számos egyéb faktor járulhat hozzá a DC-ek éréséhez, mint a különböző pro-inflammatórikus citokinek keveréke (IL-1 β , IL-6 és TNF α), mely citokinekkel történő aktiváció híven tükrözi az *in vivo* fertőzéses illetve gyulladásos körülményeket. Ezzel szemben a TGF β , IL-10 vagy kortikoszteroidok alkalmazása tolerogén DC-ek kialakulását eredményezi, mely a regulatórikus T-sejtek megjelenésének kedvez.

1.3. Mintázat felismerő receptorok

A DC-ek számos mintázat felismerő receptorral (PRR) rendelkeznek, melyek konzervált patogén asszociálta molekuláris mintázatok (PAMP) felismerésével különbséget tudnak tenni a saját és nem saját struktúrák között. Polly Matzinger nevéhez fűződik a „Veszély Modell” definiálása, mely szerint a PRR-ok a patogén struktúrák érzékelése mellett a sérült sejtekből, szövetekből felszabaduló endogén molekulákat (DAMP) is veszély jelként képesek érzékelni. A PAMP-ok és DAMP-ok hasonló jelátvitel pályákat indítanak el, mely a gyulladásos folyamatokban részt vevő molekulák génátírást eredményezi. Emlősökben a PRR-oknak 4 fő típusát írták le: Toll-szerű receptorok (TLR), RIG-szerű receptorok (RLR), NOD-szerű receptorok (NLR) és C-típusú lektin receptorok (CLR).

A PRR-ok legelső és legjobban karakterizált családja a TLR molekula család, melynek eddig 10 tagját azonosították emberben és 13-at egérben. A TLR-ok transzmembrán proteinek, melyek szerkezetüket tekintve 3 fő strukturális egységből épülnek fel: az antigén felismeréséért felelős leucinban gazdag (LRR) régióból, a

helikális transzmembrán doménből és az intracelluláris Toll/IL-1R (TIR) doménből, mely utóbbi a jelátviteli folyamatok elindítását végzi. Sejten belüli elhelyezkedésük és ligand specifikitásuk alapján a humán TLR család tagjai két fő csoportba sorolhatóak. A TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 és TLR6 a plazmamembránban találhatóak meg és számos mikrobiális komponenset, köztük fehérjéket, lipideket és lipoproteineket is képesek felsimerni. A TLR3, TLR7, TLR8 és TLR9 molekulák intracelluláris kompartmentek membránjában helyezkednek el és dupla-szálú vagy szimpla-szálú RNS vagy DNS érzékelésében vesznek részt. A TLR10-ről nemrégiben derült ki, hogy a TLR2 molekulával heterodimert alkotva számos mikrobiális termék felismerésében vesz részt. Feltételezik továbbá, hogy a virális fertőzések belső szenzoraként is működhet, azonban a specifikus ligandját eddig még nem sikerült azonosítani. A megfelelő ligand kötődését követően a TLR receptorok dimerizálódnak, mely lehetővé teszi az adaptor molekulák kötődését és a kapcsolódó jelátvitel pályák elindítását. Minden TLR molekula képes a myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) adaptor molekulát aktiválni a TLR3 kivételével, mely a TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) adaptor fehérjét használja a jelátviteli kaszkád beindításához. A TLR4 a MyD88 és TRIF molekulákat is képes adaptorként használni, ezáltal sokrétű és erőteljes immunválaszt képes indukálni.

CLR család tagjai kalcium függő lektin szerű receptorok, melyek a szénhidrát felismerő doménjük révén bakteriális, virális és gomba eredetű ligandok széles skáláját képesek megkötni. Ezen receptorok aktivációja pro- és anti-inflamatorikus immunválaszt is képes indukálni, ezért a CLR-ekről feltételezik, hogy fontos szabályozó szerepet töltenek be az immunológiai egyensúly fenntartásában.

A citoplazmatikus patogén szenzorként működő NLR-ek központi nukleotid kötő oligomerizációs doménből (NBD) és C-terminális LRR kötő doménből épülnek fel. Néhány NLR molekula N-terminális doménja (CARD) emellett kaszpáz kötő domént (CARD) is tartalmaz. A NOD1 és NOD2 a Gram pozitív és Gram negatív baktériumok sejtfalalkotó peptidoglikán komponenseit ismeri fel. Nemrégiben jutottak annak a felismerésére, hogy a NOD2 részt vesz a ssRNS által kiváltott I. típusú IFN termelésében, ezáltal pedig a gazdaszervezet vírusokkal szembeni védekezésben.

Az RLR család 3 ismert tagja a retinoic acid inducible gene I (RIG-I), a melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) és a laboratory of genetics and physiology 2

(LGP2), melyek a citoplazmába bekerülő virális eredetű vagy feldolgozott saját RNS-eket ismernek fel és gyulladáshoz választ váltanak ki. Az RLR-ek a TLR-ekkel és egyéb jelátviteli hálózatokkal együttműködve képesek befolyásolni a veleszületett és szerzett immunválasz alakulását.

Az immunrendszer aktivációja a patogének elpusztítása mellett a környező szövetek károsodását is okozza, mely nagymértékű kiterjedése patológiás elváltozások, mint autoimmun betegségek, rák vagy szisztémás gyulladáshoz vezet (SIRS). A túlzott mértékű immunreakció elkerülése és a megfelelő egyensúly fenntartása éppen ezért egy erős szabályozás meglétét igényli. Bizonyos immunsejtek, mint a DC-ek vagy makrofágok endotoxinnal (lipopoliszacharid, LPS) történő előkezelése válaszképtelenséget okoz a további LPS-dal történő stimuláció hatására. Ezen jelenség az endotoxin tolerancia (ET), melyre jellemző a gyulladáshoz vezető mediátorok csökkent és az antiinflammatorikus citokinek fokozott termelése, mely megakadályozza egy másodlagos nagy dózisos LPS-dal szemben kialakuló túlzott válaszreakció létrejöttét. Ismeretes, hogy az LPS stimuláció hatására számos negatív szabályozó fehérje aktiválódik, melyek autokrin módon, negatív visszacsatolás útján gátolják a TLR4 jelátviteli pályát. A LPS-dal tolerizált sejtekben fokozódik az interleukin-1 receptor-associált kináz M (IRAK-M) és suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) negatív szabályozó fehérjék expressziója, mellyel párhuzamosan nő az antiinflammatorikus IL-10 és TGF β citokinek termelése. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy az LPS előkezelés nem egy teljes gátláshoz, hanem a gének kifejeződésének átprogramozásához vezet.

1.4. Az mTOR szerepe az immunrendszer működésének szabályozásában

A mammalian target of rapamycin (mTOR) a PI3K-related kinase (PIKK) család egyik tagja, mely számos sejtéleti folyamat, mint a sejtproliferáció, differenciáció, metabolizmus vagy túlélés szabályozásában vesz részt. Az mTOR komplex 1 (mTORc1) és mTOR komplex 2 (mTORc2) multiprotein komplexek tagjaként fejtheti ki hatását, melyekre jellemző, hogy eltérő sejtéleti folyamatokat, jelátviteli útvonalakat szabályoznak.

Az mTOR emellett kulcsfontosságú szerepet tölt be az immunrendszer működésének szabályozásában is. Az mTORc1 működésének gátlása fedte fel, hogy az mTOR-nak

esszenciális szerepe van a különböző eredetű DC-ek differenciálódása és érése során. Az mTOR gátló rapamicin jelenlétében végzett TLR stimuláció módosítja számos DC típusban a gyulladáshoz szükséges citokinek, antiinflammatorikus mediátorok valamint az I. típusú interferonok termelését. A pDC-ek rapamicinnel történő előkezelése erőteljesen csökkenti a TLR9-mediálta IFN α/β termelést az IRF7 transzkripció faktor működésének gátlása révén. Az I. típusú IFN-ok valamint gyulladáshoz szükséges citokinek termelése szintén gátolt a TLR7-liganddal aktivált humán pDC-ekben. Keratinocitákban az IRF3 foszforilációja és az IFN β termelése korlátozott rapamicin jelenlétében, mely az mTOR I. típusú IFN termelésben betöltött szerepét hangsúlyozza ezen sejtekben. Ugyanezen tanulmány szerint a polyI:C-indukált c-Jun amino-terminal kinase (JNK) foszforilációját is gátolja a rapamicin, továbbá feltételezik, hogy az mTOR a MAPK útvonallal együttműködve szabályozza a polyI:C által kiváltott IL-1 β , TNF α és IFN β termelést. Mindazonáltal eddig még nem végeztek arra irányuló kísérleteket, hogy az mTOR befolyásolja-e a konvencionális DC-ek TLR3-mediálta I. típusú IFN termelését.

2. Célkitűzések

1. cél: Az endotoxin tolerancia kialakulásának és mechanizmusának vizsgálata moDC-ekben

A természete immunitás számos sejtjében megfigyelték már az endotoxin tolerancia kialakulást, mely a sejtek további LPS stimulációra történő válaszképtelenségét okozza. Kevés ismeret áll még rendelkezésünkre a folyamat háttérében álló szabályozó mechanizmus működéséről, ezért célul tűztük ki annak vizsgálatát:

- hogyan befolyásolja az alacsony dózisu LPS-dal történő hosszútávú előkezelés a moDC-ek fenotípusos és funkcionális sajátosságait.
- hogy egyéb mikrobiális termékek is képesek-e toleranciát kiváltani moDC-ekben.
- milyen negatív szabályozó mechanizmusok aktiválódnak a LPS-dal történő kezelés korai fázisában.
- hogy bizonyos gátló molekulák, hogyan hatnak a moDC-ek aktivációjára.

2. cél: Az mTOR szerepének tanulmányozása a cDC-ek IFN termelésének szabályozásában

mTOR a veleszületett és szerzett immunitás számos aspektusát irányítja. Nemrégiben fedték fel, hogy az mTOR fontos szabályozó szerepet tölt be a pDC-ek I. típusú IFN termelésében. A pDC-hez hasonlóan a konvencionális DC-ek is képesek antivirális hatással bíró citokineket termelni, azonban ezen sejtekben az mTOR lehetséges szabályozó szerepét még nem vizsgálták. Ezért célul tűztük ki:

- az mTOR szerepének vizsgálatát a TLR3 liganddal aktivált moDC-ek és CD1c⁺ DC-ek fenotípusos sajátosságaira.
- annak feltárását, hogy az mTOR gátló rapamicin képes-e befolyásolni az moDC-ek és CD1c⁺ antivirális kapacitását.
- annak felfedését, hogyan szabályozza az mTOR a polyI:C-indukálta I. és III. típusú IFN-ok termelését moDC-ekben.

3. Anyagok és módszerek

Reagensek

LPS, CL075, HKSA, Zymosan, Pam3Cys és polyI:C TLR ligandokat az InvivoGen-től (San Diego, CA, USA) szereztük be. A szolubilis CD40L, IFN γ , TNF, IL-1, IL-6 és IL-4 citokinek a PeproTech EC cégtől származnak (London, UK) míg a GM-CSF a Gentauro Molecular Products-tól (Brussels, Belgium). A poliklonális IL-10 neutralizáló antitest és a kecske izotípus kontroll antitest az R&D Systems-től származik (Minneapolis, MN, USA). Az mTOR inhibitor rapamycint (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 100 nM, míg az LY-294002 PI3K inhibitor (SIGMA-Aldrich, Schnellendorf, Germany) 10 μ M koncentrációban alkalmaztuk.

Humán sejtpopulációk izolálása és differenciáltatása

A kísérleteinkhez használt vérkészítményeket a debreceni Regionális Vérellátó Központ bocsátotta rendelkezésünkre az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatójának és a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásaitikai Bizottságának írásos engedélyével. A leukocita-dúsított vérkészítményekből a PBMC-t Ficoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) gradiens centrifugálási módszerrel nyertük ki. A monocitákat CD14 ellenanyaggal konjugált mágneses gyöngyök segítségével pozitívan szeparáltuk (Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach, Germany). A tisztított sejteket ezt követően 10^6 - 2×10^6 sejt/ml sejtsűrűségben 10% FBS-sel dúsított RPMI-1640 tápfolyadékban differenciáltattuk (both from Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA), 75-80 ng/ml GM-CSF (Gentaur) és 50-100 ng/ml IL-4 (Peptidech) jelenlétében. A cDC-eket a CD1c izolációs kit segítségével szintén PBMC-ből nyertük ki (Miltenyi Biotech), majd 10% FBS-t tartalmazó RPMI-1640 tápfolyadékban kultiváltuk 20 ng/ml GM-CSF jelenlétében. Citometriás mérési adataink szerint a CD1c⁺ DC-ek tisztasága átlag $97.7 \pm 1.2\%$. Autológ naív CD8⁺ T-sejteket a humán CD8⁺ T-sejt izoláló kit (Miltenyi Biotech) segítségével nyertük ki PBMC-ből. A T-sejtek tisztaságát CD45RA-FITC és CD8-PE ellenanyagokkal történő jelölést követően áramlási citometriával ellenőriztük, mely szerint a dupla pozitív T-sejtek aránya $87.3 \pm 5.6\%$.

Autológ T-sejt és moDC kokultúra létrehozása és vizsgálata

Az aktivált moDC-eket 1:5 arányban 5 napig inkubáltuk naív autológ CD8⁺ T-sejtekkel 1µg/ml anti-human CD3 monoklonális antitest (BD Pharmingen) jelenlétében RPMI médiumban. Ezt követően a T-sejteket 50 ng/ml PMA és 500 ng/ml ionomycin (both from SIGMA-Aldrich) hozzáadásával stimuláltuk GolgiStop jelenlétében (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 4 órán keresztül. A sejteket CD8-PE, CD25-FITC és IgG1-FITC antitestekkel jelöltük (both from BD Pharmingen), fixáltuk és permeabilizáltuk a BD cytofix/cytoperm oldat segítségével, majd intracellulárisan jelöltük IFN γ -APC (BD Pharmingen) és foxp3-APC antitestekkel (R&D Systems).

Áramlási citometria

A DC-ek fenotípusos sajátosságait áramlási citometriával mértük, melyhez a következő antitestekkel jelöltük a sejteket: anti-PD-L1-PE (BD PharMingen, San Diego, CA, USA), anti-CD80-FITC, anti-CD86-PE (R&D Systems), anti-CD40-FITC, anti-CD83-PE, anti-HLA-DQ-FITC (BioLegend, San Diego, CA, USA). A FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) mért adatokat a FlowJo szoftver segítségével értékeltük ki (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Citokin termelés mérése

A sejt kultúrák felülúszóját 24 órás aktivációt követően gyűjtöttük be. A TNF és IL-12p70 citokinek termelését a human BD OPTeIA™ TNF és IL-12p70 ELISA kitek (BD Pharmingen) segítségével mértük. Az IFN α és IFN β mennyiségének meghatározásához a VeriKine™ Human Interferon Alpha és Beta ELISA kitek használtuk (PBL Interferon Sources, Piscataway, NJ, USA). Az IFN λ 1 és IL-27 citokinek szintjének méréséhez a humán IL-29 és IL-27 ELISA Ready-Set Go kitek alkalmaztuk (eBioscience, San Diego, CA, USA).

Valós idejű kvantitatív PCR (Q-PCR)

A TRI Reagenssel történő RNS izolálását követően (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) a reverz transzkripciót az Applied Biosystems High Capacity cDNA RT kitjének (Carlsbad CA) alkalmazásával végeztük. A PCR-hez szükséges génspecifikus oligo mixeket szintén az Applied Biosystems-től vásároltuk. Az

eredményeket a ciklofilin, h36B4 vagy a mikroRNS-ek esetében az RNU48 háztartási génekre normalizáltuk (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). A Q-PCR vizsgálatokat az ABI StepOne Real Time PCR készülékén végeztük (Applied Biosystems) és a kiértékeléshez a StepOne v2.1 szoftvert használtuk (Applied Biosystems).

Western blot

A proteinek extrakciójához a sejteket Laemmli pufferben lizáltuk. A protein lizátumokat 10 percig 100 fokon inkubáltuk, majd 7.5% vagy 10% SDS-PAGE gélen szeparáltuk, melyet követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra elektro-blottoltunk (BIO-RAD Laboratories Inc, Germany). Az aspecifikus kötődések elkerülés végett a membránokat 5% zsírszegény tejport tartalmazó TBS-Tween-ben blokkoltuk. A pIRF3 antitestek alkalmazása esetében a blokkolást 5% BSA-t (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) tartalmazó TBS-Tween-ben végeztük. Anti-IRF3, anti-pIRF3 (Ser396), anti-TBK1 (all from Cell Signaling, Danvers, MA, US), anti- β -actin (Sigma-Aldrich) és anti-TLR3 (Abcam, Cambridge, UK) antitesteket 1:500 vagy 1:1000 hígításban használtuk; a másodlagos antitestet pedig (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) 1:5000-ben. A fehérjék detektálásához a kemilumineszcian alapuló ECL technikát alkalmaztuk (SuperSignal West Pico/ Femto Chemiluminescent Substrate; Thermo Scientific, Rockford, IL, US). Ezt követően a fehérje sávok optikai denzitását a Kodak 1D Image Analysis Szoftver 3.6 verziójának segítségével határoztuk meg (Kodak Digital Science Imaging, Eastman Kodak Company, New Haven, CT, USA).

RNS interferencia

Minden gén sepcifikus és negatív kontroll siRNS-et a Life Technologies-tól rendeltük az IRAK-M siRNS és a megfelelő negatív kontrolljának kivételével, melyet a Thermo Scientific Dharmacon (Lafayette, CO, US) cégtől szereztünk be. A miR-146a és miR-155 gátló mikroRNS LNA-inhibitorok és kontrolljaik az Exiqon-tól, míg a miR-146a, miR-155 és a kontroll mikroRNS prekursorok az Applied Biosystems-től származnak. A sejteket Opti-MEM medium (Life Technologies) transzfektáltuk a GenePulser Xcell műszer segítségével (Bio-Rad).

Foszfo-protein array

A méréshez a monocitákat 6-lyukú tenyésztőedényben kultiváltuk 10^6 sejt/ml sejtsűrűségben. 3 nap után a DC-eket polyI:C-vel aktiváltuk, majd 20 perc elteltével a leállítottuk a reakciót jéghideg PBS hozzáadásával. Ezt követően a sejteket a humán foszfo MAPK array kit-hez (R&D Systems Minneapolis, MN, USA) tartozó lízis puffer segítségével lizáltuk. Minden egyes human foszfo-MAPK array membránt egy éjszakán át inkubáltunk a sejtlyzátumok és a megfelelő foszforilált fehérje specifikus ellenanyagok keverékével. A sztreptavidin-HRP hozzáadását követően a foszforilált fehérjék detektálásához a kemilumineszcencián alapuló ECL technikát alkalmaztuk. Az optikai denzitását a Kodak 1D Image Analysis Szoftver 3.6 verziójának segítségével határoztuk meg. A foszforilált fehérjék relatív expresszióját a pozitív kontroll értékeivel normalizálva határoztuk meg.

Microarray analízis

A 2 napig 5 ng/mL LPS jelenlétében differenciált moDC-eket TRI reagensben lizáltuk (Invitrogen), melyet RNeasy oszlopokon végzett DNáz kezeléssel egybekötött tisztítás követett (Qiagen). A tisztított mintákat Cy5-tel jelöltük, majd ezt követően Illumina Whole Genome HT12 microarray-re hibridizáltuk a gyártó utasításai szerint. Az adatok kiértékelése az Illumina BeadStudio szoftverrel történt.

Statisztikai analízis

A western blot eredmények statisztikai analíziséhez Student-féle t-próbát alkalmaztunk, míg az áramlási citometriás, Q-PCR és ELISA adatok szignifikancia szintjének meghatározásához varianciaelemzést (ANOVA Bonferroni post-hoc teszttel) végeztünk a GraphPad Prism v.6. szoftverrel (GraphPad Software Inc. , La Jolla, CA, USA).

Szignifikancia szintek: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. n.s. , nem szignifikáns.

4. Eredmények

4.1. Az endotoxin tolerancia módosítja a human moDC-ek funkcionális sajátosságait

4.1.1. A LPS jelenlétében differenciáltatott moDC-ekben gátolt a gyulladásos citokin gének kifejeződése

A LPS-dal krónikusan aktivált DC-ek gátolt funkcióinak háttérében álló mechanizmusok megismeréséhez elsőként a LPS-indukálta IL-12, TNF és IL-6 gének kifejeződését vizsgáltuk meg 5 ng/ml LPS-dal 2 napig előkezelt illetve kezeletlen moDC-ekben. A 2 napig LPS jelenlétében differenciálódó sejtek IL-12, TNF és IL-6 citokin génjeinek expressziója teljesen gátlódott, míg a kontroll sejtekben a második LPS stimuláció jelentősen fokozta a vizsgált gének kifejeződését. Ezt követően az LPS mellett számos TLR ligand illetve citokin jelenlétében differenciáltattuk a moDC-eket annak megállapításához, hogy a LPS-indukálta DC inaktiváció egyedi jelenség-e vagy egyéb stimulációs szignálok is képesek a DC-ek működését gátolni. Számos önállóan alkalmazott aktivációs szignál fokozta a TNF citokin termelését, úgymint a TLR2-ligand HKSA, vagy a TLR7/8-ligand CL075. Emellett a CD40L, HKSA, Pam3Cys, CL075 aktivációval vagy a citokin koktéllal párhuzamosan alkalmazott LPS kezelés még erőteljesebben fokozta a TNF termelését. Ezzel szemben a TNF, IFN γ és a TLR3 ligand polyI:C nem vagy alig stimulálta a DC-ek TNF szekrécióját. A 2. nap 100 ng/mL LPS-dal újra aktivált sejtek TNF citokin termelése teljesen gátlódott a CD40L, HKSA, Pam3Cys, CL075, TNF vagy az IL-1 β , IL-6, TNF citokin koktéllal történő előkezelés esetében. Az LPS 48 órás jelenléte perzisztens DC inaktivációt okozott akkor is, amikor ezen stimulusokat a kis dózisu LPS-dal együtt alkalmaztuk. Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy az aktivációs szignálok széles skálája képes deszenzitizálni a fejlődő moDC-eket.

4.1.2. A LPS számos, a sejt aktivációt gátló faktor megjelenését indukálja moDC-ekben

A krónikus LPS stimulációval kiváltott DC inaktivációért felelős molekuláris folyamatok feltérképezéséhez összehasonlítottuk a kis dózisu LPS jelenlétében 2 napig differenciálódó moDC-ek és a kontroll kezeletlen sejtek gén expressziós profilját az Illumina microarray technológia segítségével. A kontroll sejtekhez viszonyítva számos

negatív szabályozó fehérje (CD150, SOCS2, SOCS3, LILRB2, S100A8, S100A9) kifejeződése szignifikánsan emelkedett a 2 napig LPS kezelésben részesülő sejtekben. Az IL-10 citokin termelése és a miR146a expressziója is fokozódott a LPS előkezelés hatására, azonban néhány gátló faktor (ATF3, SOCS1, STAT3, IRAK-M) kifejeződésében nem találtunk különbséget. Ezt követően számos potenciális gátló faktor expresszióját vizsgáltuk időfüggő módon, mely eredményeink szerint a SOCS1, SOCS2, SOCS3, IRAK-M, ATF3, S100A8, S100A9, STAT3, LILRB2, I κ B α , I κ B β és CD150 DC működést gátló faktorok kifejeződése már a differenciálódás első napján markánsan fokozódik a LPS-dal előkezelt sejtekben a kontroll sejtekhez viszonyítva. A kezdeti emelkedést követően azonban gyorsan csökkent a vizsgált gének expressziója, mely arra utal, hogy ezen faktorok csupán egy limitált időintervallumon belül fejtik ki hatásukat, azonban hosszantartó DC inaktivációt nem okozhatnak.

4.1.3. A LPS-indukálta SOCS1, STAT3, SLAM, IL-10 és miR-146a molekulák nem okoznak perzisztens DC inaktivációt

Ezt követően átfogó tanulmányt végeztünk a LPS-indukálta negatív szabályozó fehérjék moDC funkcióra kifejtett hatásának vizsgálatához. Ehhez a sejteket specifikus siRNS-ekkel (SOCS1, SOCS2, SOCS3, STAT3, CD150, S100A8, S100A9 és IRAK-M) vagy miR146a és miR155 inhibitorokkal illetve ezek kontrolljával transzfektáltuk, majd két napig differenciáltattuk alacsony dóziszú LPS jelenlétében vagy anélkül. Második aktivációként a nagy dóziszú LPS mellett ezúttal a TLR7/8 ligand CL075-öt is alkalmaztuk, majd 24 óra elteltével mértük a sejtek IL-12 citokin termelését. A LPS indukálta IL-10 termelés szerepének vizsgálatához IL-10 neutralizáló antitesttel kezeljük a sejteket a LPS előkezelés időtartama alatt illetve a reaktiváció során is. A STAT3, CD150, miR-146a és IL-10 funkciójának gátlása erőteljesen fokozta a második nap LPS-dal vagy CL075-tel stimulált sejtek IL-12 termelését. A SOCS1-specifikus siRNS-sel transzfektált sejtekben fokozódott a LPS indukálta IL-12 termelés, azonban a CL075 aktiváció esetében nem tapasztaltunk különbséget. A miR-146a és miR-155 moDC aktivációra kifejtett hatásának további vizsgálatához a mikroRNS-ek prekursoraival transzfektáltuk majd a 2. napon LPS-dal, poly(I:C)-vel, CL075-tel vagy CD40L-dal stimuláltuk a sejteket. A fejlődő DC-ek fokozott miR-146a és miR-155 expressziója az IL-12 és TNF termelés csökkenését eredményezte az összes alkalmazott aktivációs

szignál esetében. A SOCS2, SOCS3, IRAK-3, S100A8 és S100A9 gátlása nem befolyásolta vagy éppen csökkentette az IL-12 szekrécióját, mely ezen faktorok DC inaktivációban betöltött elhanyagolható szerepére utal. A vizsgált molekulák egyikének gátlása sem befolyásolta azonban jelentős mértékben a LPS előkezelés által kiváltott IL-12 termelésre gyakorolt gátló hatást egy második stimuláció alkalmazását követően. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a DC differenciálódás korai szakaszában történő aktiváció a vizsgált szabályozó fehérjéktől függetlenül alakítja ki a sejtek további stimulációval szembeni válaszképtelenségét.

4.2. Az mTOR szabályozza a human DC-ek funkcionális sajátosságait

4.2.1. Az mTOR funkcionálisan aktív állapotban, konstitutívan fejeződik ki humán cDC-ekben

Az mTOR expressziójának meghatározásához frissen izolált monocitákat differenciáltattuk GM-CSF és IL-4 jelenlétében 7 napig. Ez idő alatt minden egyes nap gyűjtöttünk be sejteket az mTOR kifejeződésének mRNS szintű méréséhez. Eredményeink szerint az mTOR konstitutívan expresszálódik a moDC-ek differenciálódása során. A MAPK array-ből származó adataink szerint mind a 3, mind az 5 napos nyugvó moDC-ekben funkcionálisan aktív állapotban van jelen az mTOR. Továbbá úgy találtuk, hogy a vérben keringő CD1c⁺ DC-ek a moDC-ekhez hasonló szinten fejezik ki az mTOR molekulát és a TLR3 receptort. Mivel a 3 napos moDC-ekben konstitutívan expresszálódik az mTOR és jelen van a TLR3 molekula további kísérleteink elvégzéséhez ezen sejteket választottuk a primer CD1c⁺DC-ek mellett.

4.2.2. Az mTOR módosítja a DC-ek sejt felszíni molekuláinak kifejeződését

A rövid idejű rapamycin előkezelés polyI:C-vel (TLR3 ligand) történő stimulációra kifejtett hatásának vizsgálatához áramlási citometriás módszerrel mértük a CD83 aktivációs marker, az MHC II családba tartozó human leukocyte antigen-DQ (HLA-DQ) és számos kostimulációs molekula kifejeződését moDC-ekben és CD1c⁺ DC-ekben. A CD83 polyI:C-indukálta expresszió növekedését nem befolyásolta a rapamycin jelenléte, azonban a HLA-DQ, CD40, CD80 és CD86 molekulák fluoreszcencia intenzitását szignifikánsan csökkentette. A regulatórikus T-sejtek

fejlődését segítő programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) gátló molekula kifejeződését megvizsgálva úgy találtuk, hogy a rapamycin gátolta a polyI:C-mediált expresszió emelkedést. A CD1c⁺ DC-ekben hasonló eredményeket kaptunk a CD40, CD80 és PDL-1 molekulák kifejeződését tekintve. A moDC-ekkel szemben azonban a CD1c⁺ DC-ek HLA-DQ expresszióját nem befolyásolta, míg a CD83⁺ sejtek arányát szignifikánsan fokozta a rapamycinnel történő előkezelés. Mindezek az eredmények arra utalnak, hogy az mTOR eltérően szabályozza számos sejtfelszíni molekula kifejeződését a két DC populációban.

4.2.3. A rapamycin előkezelés gátolja a polyI:C-vel stimulált moDC-ek antivirális immunválaszát

Az mTOR DC jelátvitelben betöltött szerepének vizsgálatához elsőként az antivirális citokinek polyI:C indukálta kifejeződését hasonlítottuk össze a rapamycinnel előkezelt és kontroll sejtekben. Az mTOR aktivitásának rapamycinnel történő gátlása szignifikánsan csökkentette az IFN α 1, IFN β , IFN λ 1, IFN λ 2 gének expresszióját moDC-ekben. Mindezeket az eredményeket fehérje szintű mérésekkel is alátámasztottuk, mely szerint az IFN β termelése markánsan és az IFN α valamint IFN λ 1 szekréciója szignifikánsan csökken. Az IL-27 szintén egy antivirális aktivitással bíró citokin, mely elsősorban az effektor CD8⁺ T-limfociták fejlődését promótálja. Génszintű vizsgálataink szerint a p28 alegység kifejeződése gátlódik, míg az EB13 alegység expressziója fokozódik a rapamycinnel előkezelt és polyI:C-vel aktivált sejtekben. Az mTOR szabályozó szerepének további tanulmányozása során vizsgáltuk a rapamycinnel előkezelt moDC-ek naiv CD8⁺ T-sejt funkciókra kifejtett hatását. Ehhez a moDC-eket és T-sejteket kokultiváltuk 5 napig, majd áramlási citométerrel mértük az IFN γ -termelő T-sejtek arányát. Az mTOR funkció kiesése markánsan csökkentette a polyI:C-vel aktivált moDC-ek T-sejt stimuláló hatását, beleértve a CD25 memória T-sejt marker kifejeződésének fokozását is. Mindazonáltal egyik kezelés hatására sem tapasztaltuk a CD8⁺foxp3⁺ regulatórikus T-sejt populáció megjelenését. A foxp3⁺ T-sejt populáció hiánya valószínűleg a PD-L1 csökkent kifejeződésével áll összefüggésben, mely gátló molekuláról kimutatták, hogy esszenciális a T-sejtek regulatórikus irányba történő differenciálódásához.

4.2.4. Az mTOR szabályozza a CD1c⁺ DC-ek antivirális aktivitását

A moDC-ekhez hasonlóan az előző fejezetben taglalt kísérleteinket primer CD1c⁺ DC-ekben is elvégeztük. A moDC-ekhez hasonlóan az összes vizsgált I. és III. típusú IFN valamint az IL-27 p28 alegységének expressziója is szignifikánsan csökkent rapamycin kezelés hatására, míg az IL-27 EB13 alegységének kifejeződése fokozódott polyI:C-vel történő aktivációt követően. Fehérje szintű méréseink szerint a rapamycin jelenléte markánsan csökkenti az IFN α és teljesen gátolja az IFN β és IFN λ 1 szekrécióját CD1c⁺ DC-ekben, mely az mTOR CD1c⁺ DC funkciókban betöltött kiemelkedő szerepére utal. Mindemellett a polyI:C-indukálta CD1c⁺ DC-ek képesek voltak az IL-27 protein szintű kifejezésére is, melyet a rapamycin jelenléte ismételt gátolt. Ezen eredményeink azt bizonyítják, hogy az mTOR jelentősen hozzájárul a funkcionálisan aktív IL-27 szekréciójához valamint nélkülözhetetlen szerepet tölt be a CD1c⁺ DC-ek I. és III. típusú IFN termelésében.

4.2.5. Az mTOR gátlása csökkenti az IRF3 transzkripció aktivitását

A következő lépésben az interferonok termeléséért felelős interferon regulatory factor 3 (IRF3) transzkripció faktor aktivitását határoztuk meg. Ehhez először az interferon stimulated gene 56 (ISG56) expresszióját mértük, mely az IRF3 transzkripció aktivitásának érzékeny szenzora. Eredményeink szerint az ISG56 kifejeződése szignifikánsan csökken rapamycin előkezelés hatására a polyI:C-vel aktivált sejtekben. A következőekben az IRF3 foszforilációját Western blot technikával mértük időfüggő módon és úgy találtuk, hogy a polyI:C-stimulációt követő 2. órában az IRF3 foszforilációja jelentősen fokozódik, mely folyamatot gátol a rapamycinnel történő előkezelés. Ezen adataink szerint az mTOR jelentős szerepet játszik az IRF3 aktivitásának szabályozásában.

4.2.6. A MAPK jelátviteli pálya szabályozása nyugvó és polyI:C-vel aktivált moDC-ekben

A TLR család számos tagja köztük a TLR3 is képes a MAPK útvonal elindítására, mely jelátviteli pálya számos gyulladáshoz vezető mediátor termeléséhez járul hozzá. 26 különböző kináz és szabályozó fehérje aktivációját vizsgáltuk egy foszfo-protein array segítségével annak megállapítására, hogy a rapamycin előkezelés befolyásolja-e a MAPK útvonal

működését. A MAPK útvonal számos tagját nem érintette a rapamycinnel történő előkezelés sem a nyugvó, sem a polyI:C-vel aktivált moDC-ekben. A rapamycin jelenléte fokozta a nyugvó sejtek Aktpan, JNK3 és p38 γ foszforilációját, azonban gátolta ezen molekulák polyI:C-stimulálta aktivációját. Ezen adatok arra utalnak, hogy az mTOR a sejtek aktiváltsági állapotától függően eltérően befolyásolja a MAPK útvonal tagjainak működését.

4.2.7. A TBK1 és a PI3K/mTOR jelátviteli útvonal együttműködik az I. és III. típusú IFN-ok optimális expressziójának szabályozásában

A rapamycin által kiváltott csökkent I. és III. típusú IFN termelés háttérben álló mechanizmus feltárásához két a TLR3 jelátvitelben szerepet játszó molekula működését gátoltuk. A PI3K inhibitor LY-294002-et a rapamycinhez hasonlóan előkezelésként használtuk polyI:C-vel történő aktiválást megelőzően. A TANK-binding kinase (TBK1) kifejeződését géncsendesítéses technikával gátoltuk. Eredményeink szerint az LY-294002-vel történő előkezelés a rapamycinnel megegyező szinten gátolja a PolyI:C-stimulálta IFN β és IFN λ 1 transzkripció szintjét. Amennyiben a két gátlószert együttesen alkalmaztuk, nem tapasztaltunk nagyobb fokú gátlást az IFN gének kifejeződésében, mely eredmények arra utalnak, hogy a PI3K és az mTOR ugyanazt az útvonalat használja az IFN-ok expressziójának fokozásához.

A TBK1-csendesítés a rapamycinhez hasonló szinten gátolta az IFN β és IFN λ 1 gének kifejeződését. Amennyiben a polyI:C-vel történő aktiváció előtt rapamycint adtunk a TBK1-depletált sejtekhez markáns csökkenést tapasztaltunk az IFN β gén kifejeződésében, mely csökkenés az IFN λ 1 esetében szignifikánsnak bizonyult.

Ezen eredményeink szerint az mTOR a klasszikus PI3K/Akt/mTOR útvonalon keresztül fejt ki hatását, mely a TRIF-médiálta TBK1 kinázzal kollaborációban működve szabályozza az optimális I. és III. típusú IFN-ok termelését.

5. Megbeszélés

A dendritikus sejtek az immunrendszer szabályozásában betöltött központi szerepüknek köszönhetően az immunterápiás eljárások és vakcinák ígéretes jelöltjeivé váltak. A DC-ek a patogén mintázatok és veszély jelek széles skáláját képesek felismerni, emellett az immunrendszer számos sejtfeleségével való kommunikáció révén képesek összeköttetést teremteni a természetes és szerzett immunrendszer működése között. Az őket érő környezeti hatások nagymértékben befolyásolják az immunogén illetve tolerogén irányba történő differenciálódásukat, mely irányításában számos szabályozó molekula vehet részt. Ezen komplex szabályozó folyamatok egy része már ismert, azonban a részletes feltárásuk további vizsgálatokat igényel. Jelen tanulmányban célul tűztük ki a perzisztens mikrobiális stimuláció moDC funkciókra kifejtett hatásának vizsgálatát, ugyanis a mikrobiális komponensek és gyulladási mediátorok állandó jelenléte a gyulladt szöveti környezetben befolyásolhatja a keringésből kilépő monociták DC irányú differenciálódását. Emellett egy széles körben elterjedt immunosuppresszív hatású szer, a rapamycin eltérő DC alpopulációk antivirális funkcióira kifejtett hatását tanulmányoztuk.

Eredményeink szerint a moDC-ek korai és perzisztens LPS-dal történő stimulációja gátlólag hat a későbbi aktivációs szignálokkal kiváltott gyulladási citokintermelésre. Továbbá úgy találtuk, hogy a LPS-hoz hasonlóan számos egyéb stimulációs jel, mint a PAM3Cys, TNF α és CD40L előkezelés is a moDC-ek deszenzitizálásához vezet. Sokféle mechanizmus állhat ezen jelenség hátterében, mint a jelátviteli útvonal komponenseinek fokozott vagy csökkent kifejeződése vagy olyan gátló mediátorok termelése, melyek a DC funkciókat negatív irányban befolyásolják. Eger makrofágokon végzett kísérletek szerint az endotoxin tolerancia fő kiváltó oka a TLR4 csökkent sejt felszíni kifejeződése, azonban az általunk LPS-dal előkezelt humán moDC-ek TLR4 expressziója nem különbözött a kezeletlen kontroll sejtektől. Egy másik lehetséges mechanizmusként az IRAK-1 jelátviteli molekula csökkent expressziója merült fel. Az IRAK-1 kifejeződésének gátlása valóban alacsony IL-12 citokin termelési eredményezett moDC-ekben, mely arra utal, hogy az IRAK-1 degradációja önmagában is elég lehet a DC-ek további stimulációkkal szembeni válaszképtelenségének kialakításában. A legújabb tanulmányok szerint a humán monociták endotoxinnal

történő deszenzitizálása nem befolyásolja az IRAK-1 szintjét, azonban gátolja a K63-függő poliubikvitinációját, mely lépés az IKK γ és TRAF6 molekulákkal történő összeszerelését segíti elő, ezáltal pedig a TLR4 útvonal továbbvitelét.

Számos negatív szabályozó fehérje, mint a SOCS1, STAT3, SLAM, miR-146a és IL-10 kifejeződésének illetve működésének gátlása fokozza a LPS-indukálta IL-12 termelést, azonban eredményeink szerint a vizsgált molekulák egyike sem játszik szerepet a LPS tolerancia hosszú távú fenntartásában. Ezen molekulák által kifejtett rövid távú gátló hatás valószínűleg a génextpressziójukban történő átmeneti növekedésnek vagy egyéb gátló mechanizmusok jelenlétének köszönhető. Eredményeink emellett arra utalnak, hogy több gátló mechanizmus aktiválódik egyszerre a LPS-dal tolarizált sejtekben, melyek együttes hatása vezethet el a DC funkciók hosszútávú felfüggesztéséhez.

Tanulmányunk második felében azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolhatja az mTOR inhibitor rapamycin a humán moDC-ek és CD1c⁺ DC-ek TLR3-indukálta interferon termelését. Számos humán cDC altípus expresszálja a TLR3 receptort, melynek stimulációja az I. és III. típusú IFN-ok termeléséhez vezet. A TLR3 legnagyobb arányban a CD141⁺ DC-ekben termelődik, mely sejttípus a III. típusú IFN-ok (IFN λ) fő termelője. Eredményeink szerint a 3-napos moDC-ek és CD1c⁺ DC-ek is kifejezik a TLR3 receptor, azonban nem expresszálják az MDA5 molekulát, mely szintén képes a duplaszálú RNS-t mimikáló polyI:C-t ligandként felismerni. A polyI:C-vel történő aktiváció jelentősen fokozza ezen DC alpopulációk IFN α , IFN β és IFN λ 1 termelését, melyet a rapamycin jelenléte nagymértékben képes gátolni vagy akár fel is függeszteni. Továbbá úgy találtuk, hogy a rapamycin-mediálta IFN termelés csökkenésének hátterében az IRF3 transzkripció faktor gátolt foszforilációja állhat. Az mTOR és a TBK1 egyidejű blokkolása nagyobb mértékben csökkentette az IFN β és IFN λ 1 kifejeződését, mint a két molekula működésének külön-külön történő gátlása. A PI3K és mTOR funkcióit gátló inhibitorok együttes alkalmazásával kapott eredmények, arra engednek következtetni, hogy a PI3K és az mTOR egy útvonalon helyezkedik el és a TBK1-el párhuzamosan működve szabályozza az I. és III. típusú IFN-ok termelését. Emellett számos MAPK és intracelluláris jelátvitelt szabályozó molekula működését vizsgáltuk, mely eredmények szerint a nyugvó moDC-ek rapamycinnel történő kezelése számos kináz aktivitását fokozza. PolyI:C-vel történő aktiváció esetében azonban a rapamycin jelenléte gátlólag hatott két az IFN β termelésében szerepet játszó molekula, a

JNK3 és p38 γ foszforilációjára. Mivel a rapamycin gátolja azon MAPK-ok aktivitását, melyek fontos szerepet játszanak az I. típusú IFN-ok termelésében úgy gondoljuk, hogy az mTOR-mediálta IFN termelés részben a MAPK kaszkád irányítása alatt állhat, mely a polyI:C-indukálta jelátvitel finomszabályozásában játszhat szerepet.

Előzetes irodalmi adatok szerint az mTOR jelentősen képes befolyásolni a LPS-dal aktivált moDC-ek és CD1c⁺ DC-ek fenotípusos sajátosságait és T-sejt stimuláló kapacitását. Eredményeink szerint a polyI:C-vel történő stimuláció esetén az mTOR nem módosítja a CD83 aktivációs marker kifejeződését, viszont csökkenti számos kostimulációs molekula és a gátló hatású PD-L1 expresszióját is. Kokultivációs kísérleteink szerint a rapamycin előkezelet csökkenti a polyI:C-indukált moDC-ek CD8⁺ T-sejtek IFN γ termelő képességére kifejtett hatását. Számos tanulmány szerint a rapamycin-kezelt DC-ek támogatják a foxp3⁺ regulatórikus T-sejtek fejlődését és mikrobiális stimuláció hatására az erőteljes szupresszív hatású CD8⁺CD25⁺foxp3⁺ T-sejtek képződését indukálják. Az általunk kezelt DC-ekkel kokultúrába helyezett T-sejtekben azonban csökkent a CD25 expressziója és a foxp3⁺ kifejeződését nem sikerült detektálni. Ez a jelenség a PD-L1 sejtfelszíni expressziójának csökkenésével magyarázható, melynek megléte a regulatórikus irányú T-sejt differenciálódás előfeltétele. A rapamycin előkezelt moDC-ek PD-L1 kifejeződésének gátlása az IFN α , IFN β és IL-27 csökkent termelésének lehet a következménye, ezen citokinek ugyanis szükségesek a PD-L1 sejtfelszíni expressziójának növeléséhez.

Az immunrendszer működésének szabályozása mellett az mTOR számos fiziológiai folyamat, mint a protein szintézis, metabolizmus és autofágia regulációjában is részt vesz. Az autofágia egy konzervált katabolikus, túlélési mechanizmus, mely éhezés során az intracelluláris komponensek lebontásával biztosít energiát a sejtek számára. Ez az mTOR által negatívan szabályozott folyamat fontos szerepet játszik a DC-ek működésében, ugyanis ezen út részvételével történik az endogén antigének feldolgozása, majd prezentálása. Mindemellett az mTOR hatására az oxidatív foszforiláció a glikolízis irányába tolódik, mely a T-sejt aktiváció és proliferáció jellemző anyagcsere mechanizmusa. Hasonlóképpen a nyugvó DC-ek és makrofágok is aerob glikolízisre váltanak TLR ligandokkal történő aktiváció hatására. Az mTORc1 stabilizálja a HIF-1 α transzkripciós faktor mRNS-ét, mely molekula a glikolízis elindítása mellett kulcsszerepű gyulladásoz fehérjék termeléséhez is szükséges.

Míndezek az eredmények arra utalnak, hogy az mTOR számos jelátviteli pálya működését integrálja kapcsolatot teremtve a sejtekben zajló celluláris és immunológiai folyamatok között.

Munkánk során sikerült az mTOR által szabályozott DC funkciók egy újabb aspektusát feltárni, melyben az mTOR a TBK1 kinázzal együtt működve szabályozza a cDC1c⁺ DC-ek antivirális immunválaszát. Ezen ismeret a rapamycin terápia célú felhasználásának újabb lehetőségeit nyithatja meg olyan betegségek kezelésében, melyre az I. típusú IFN kontrollálatlan termelése jellemző. Az mTOR által szabályozott útvonalak azonosítása újabb stratégiai lehetősége teremt olyan DC vakcinák fejlesztésére, mely a fertőző betegség vagy a rák leküzdését célozzák meg.

6. Összefoglaló

Az emberi szervezet szinte minden szervében és szövetségében fellelhető dendritikus sejtek (DS) hatékony antigén prezentáló sejtekként működnek. Megváltozott saját vagy testidegen struktúrákat felismerve aktiválódnak és antigén-specifikus T-sejt választ váltanak ki. E különleges képességüknek köszönhetően a DC-ek sokrétű szabályozó funkcióval rendelkeznek és immunterápiás eljárások fejlesztésére is alkalmasak. A DC-alapú vakcinák alkalmazási lehetőségeit vírus fertőzések és tumorok kezelésére széles körben vizsgálják, de a terápiás vakcinák megfelelő hatékonyságának fokozása a DC-ek összetett működésének mélyebb szintű megismerését igényli. A jelen tanulmány a DS funkciók két eltérő, a klinikai alkalmazás szempontjából kiemelten fontos vonatkozására, az endotoxin tolerancia és az mTOR általi gátló folyamatok mechanizmusának felderítésére összpontosít. Kísérleteink azt igazolták, hogy a bakteriális lipopoliszachariddal történő 2 napos előkezelés a moDC funkciók gátlásához vezet. Ezt a hatást az aktivációs jelek széles skálája képes kiváltani és az így válaszképtelenné tett DC-ek funkcióit az együttesen alkalmazott aktivációs jelek sem képesek felfüggeszteni. Mivel a LPS-dal történő ismételt stimuláció az endotoxinnal polarizált moDC-ekben nem képes kiváltani a gyulladásos citokin gének kifejeződését, a DC-ek aktivációjához vezető jelátviteli útvonalak is gátlódnak. Eredményeink szerint az LPS előkezelés- indukálta SOCS1, STAT3, SLAM, miR-146 és IL-10 molekulák rövidtávú gátló hatás révén csökkentik a monocita-eredetű DC-ek IL-12 citokin termelését, azonban egyik vizsgált molekula sem játszik meghatározó szerepet az endotoxin tolerancia hosszú távú kialakításában.

További vizsgálataink a PI3K/mTOR jelátviteli pálya jelentőségét igazolták a polyI:C-vel aktivált moDC-ek I. és III. típusú interferon termelésének szabályozásában. Eredményeink szerint az mTOR funkciók rapamycinnel történő gátlása csökkenti az IRF3 és a MAPK útvonal bizonyos tagjainak foszforilációját, ami arra utal, hogy virális eredetű antigének jelenlétében az mTOR számos jelátviteli folyamat elindításához járul hozzá. Emellett a rapamycinnel kezelt moDC-ek kevésbé hatékonyak a CD8+ T-sejtek általi IFN γ termelés kiváltásában. Végezetül úgy találtuk, hogy az mTOR általi szabályozás, hasonlóan a moDC-ekhez, a perifériás vérben keringő CD1c+ DC-ek I. és III. típusú IFN termeléséhez is szükséges. Ezek a kutatási eredmények átfogó képet

adnak a DS funkciók szabályozásában résztvevő molekulák szerepéről a mikrobiális stimuláció hatására aktiválódó jelátviteli pályák működése során.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/210/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Fekete Tünde

Neptun kód: TC2TND

MTMT azonosító: 10036433

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fekete, T.**, Pázmándi, K., Szabó, A., Bácsi, A., Koncz, G., Rajnavölgyi, É.: The antiviral immune response in human conventional dendritic cells is controlled by the mammalian target of rapamycin.
J. Leukoc. Biol. 96, 1-11, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.2A0114-048RR>
IF:4.304 (2013)
2. **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:4.97





További Közlemények

3. Nasi, A., **Fekete, T.**, Krishnamurthy, A., Snowden, S., Rajnavölgyi, É., Catrina, A.I., Wheelock, C.E., Vivar, N., Réthi, B.: Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. *J. Immunol.* 191 (6), 3090-3099, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1300772>
IF:5.362
4. Kertész, Z., Györi, D., Körmendi, S., **Fekete, T.**, Kis-Tóth, K., Jakus, Z., Schett, G., Rajnavölgyi, É., Dobó-Nagy, C., Mócsai, A.: Phospholipase C gamma2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption. *Eur. J. Clin. Invest.* 42 (1), 49-60, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2362.2011.02556.x>
IF:3.365

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,001

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 9,274

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

Debrecen, 2014.08.28



Válogatott előadások

Tünde Fekete, Attila Szabo, Eva Rajnavolgyi, Bence Rethi: Chronic stimulation of TLR4 inhibits the pro-inflammatory cytokine production of human monocyte-derived dendritic cells

5th ENII EFIS/EJI Immunology Summer School 9-19 May 2010, Capo Caccia, Sardinia

Tünde Fekete, Attila Szabo, Eva Rajnavolgyi, Bence Rethi: Chronic LPS stimulation causes inactivation of human monocyte-derived dendritic cells

39th Congress of the Hungarian Immunological Society, 4-7 November 2010, Szeged, Hungary

Tünde Fekete, Attila Szabo, Eva Rajnavolgyi, Bence Rethi: Endotoxin tolerance in human monocyte-derived dendritic cells

4th Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, 11-14 January 2011, Galyatető, Hungary

Tünde Fekete, Kitti Pázmándi, Attila Szabó, Attila Bácsi, Gábor Koncz, Éva Rajnavölgyi: The mammalian target of rapamycin controls polyI:C-induced antiviral and inflammatory cytokine responses in human conventional dendritic cells

FEBS EMBO Conference, 30 August- 4 September 2014, Paris, France

Válogatott poszter prezentációk

Tünde Fekete, Attila Szabo, Rajnavolgyi Eva, Bence Rethi: Chronic stimulation of TLR4 inhibits the pro-inflammatory cytokine production of human monocyte-derived dendritic cells

5th ENII EFIS/EJI Immunology Summer School 9-19 May 2010, Capo Caccia, Sardinia

Tünde Fekete, Attila Szabo, Rajnavolgyi Eva, Bence Rethi: Molecular mechanisms contributing to tolerance induction in human monocyte-derived dendritic cells

Cross-Talk Workshop, Lessons from Host-Pathogenesis Interactions, 28-29 April 2011, Milano, Italy

Tünde Fekete, Attila Szabo, Rajnavolgyi Eva, Bence Rethi: Activation induced negative signals in dendritic cells

6th ENII EFIS/EJI Immunology Summer School 15-22 May 2011, Capo Caccia, Sardinia

Tünde Fekete, Kitti Pázmándi, Attila Szabó, Éva Rajnavölgyi: Rapamycin preconditioning reduces the anti-viral response of human dendritic cell subtypes

Semmelweis Symposium 7-9 November 13, 2013, Budapest, Hungary

Tünde Fekete, Kitti Pázmándi, Attila Szabó, Attila Bácsi, Éva Rajnavölgyi: Rapamycin decreases the type I and III IFN responses of human dendritic cell subtypes

World Immune Regulation Meeting VIII. 19-22 March 2014, Davos, Switzerland

8. Kulcsszavak

dendritikus sejt, Toll-szerű receptor, jelátvitel, endotoxin tolerancia, pro-inflammatórikus citokin, mammalian target of rapamycin, interferon

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítettek nyújtottak céloom eléréséhez.

Elsőként témavezetőmnek, Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának szeretnék köszönetet mondani az önzetlen és odaadó támogatásért, melyet a PhD/predoktori tanulmányaim illetve munkám során nyújtott számomra. Különösen hálás vagyok, amiért vég nélküli támogatásával hozzájárult az általam kigondolt projektek megvalósításához. Továbbá köszönöm, amiért lehetővé tette, hogy eredményeimet nemzetközi konferenciákon mutathassam be, mely óriási lehetőséget teremtett számomra szakmai tudásom bővítéséhez.

Megkülönböztetett köszönet és hála illeti Dr. Réthi Bencét, akitől közös munkáink során rengeteget tanultam. Örökké hálás leszek a végtelen türelméért, önzetlen támogatásáért és mindazért a tudásért, melyet tőle kaptam.

Köszönet illeti az Immunológiai Intézet összes munkatársát az inspiráló környezetért és az értékes szakmai javaslatokért. Külön szeretném köszönetemet kifejezni Veres Ágotának, Nagyné Kovács Erzsébetnek és Gergely Pálné Anikónak a kísérletes munkámhoz nyújtott értékes technikai segítségért.

Ez a köszönetnyilvánítás nem lenne teljes anélkül, hogy kifejezzem köszönetemet barátaimnak az általuk nyújtott támogatásért és biztatásért, mely mindvégig erőt adott nekem.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kifejezni mélyreható hálámat családomnak, különösképpen szüleimnek, akik odaadó szeretetükkel és türelmükkel mindvégig támogattak törekvéseim megvalósításában.