

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Nagyné Csumita Mária**

**Interferon reguláló faktorok DNS kötőhelyeinek  
genomszintű vizsgálata dendritikus sejtekben**

**DEBRECENI EGYETEM**

**MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022**

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Interferon reguláló faktorok DNS kötőhelyeinek  
genomszintű vizsgálata dendritikus sejtekben**

**Dr. Nagyné Csumita Mária**

**Témavezető: Dr. Széles Lajos István**



**DEBRECENI EGYETEM**

**Molekuláris Sejt- és Immunbiológia DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2022**

## Tartalomjegyzék

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Rövidítések jegyzéke .....                                                              | 3  |
| 2. Bevezetés .....                                                                         | 6  |
| 2.1. A dendritikus sejtek .....                                                            | 6  |
| 2.2. A dendritikus sejtek altípusai egérben .....                                          | 6  |
| 2.3. A MutuDC CD8 <sup>+</sup> sejt vonal .....                                            | 9  |
| 2.4. A stimulus-regulált transzkripció faktorok (SRTF-ek) .....                            | 10 |
| 2.5. Az IRF transzkripció faktorok .....                                                   | 13 |
| 2.5.1. Az IRF-fehérjék szerkezete .....                                                    | 13 |
| 2.5.2. Az IRF-ek által felismert DNS motívumok.....                                        | 14 |
| 2.5.3. IRF3, IRF5 és IRF9 és az általuk szabályozott transzkripció programok.....          | 16 |
| 2.5.3.1. IRF3 és az antivirális citokinek .....                                            | 17 |
| 2.5.3.2. Az IRF5 és az gyulladás program .....                                             | 18 |
| 2.5.3.3. Az IRF9 és az antivirális interferon-stimulált gének .....                        | 18 |
| 3. Célkitűzés .....                                                                        | 21 |
| 3.1. IRF3-, IRF5- és IRF9-specifikus kötőhelyek azonosítása és jellemzése .....            | 21 |
| 3.2. Effektor ISG-ek szabályozó régióinak azonosítása és jellemzése .....                  | 21 |
| 4. Anyagok és módszerek .....                                                              | 22 |
| 4.1. Sejttenyésztés, ligandkezelés.....                                                    | 22 |
| 4.2. ChIP-seq és ChIP-qPCR.....                                                            | 22 |
| 4.3. ChIP-seq analízis.....                                                                | 25 |
| 4.4. A motívum keresés, súlyozott motívum mátrix (PWM) és DNS szekvenciák azonosítása..... | 26 |
| 4.5. ATAC-seq kísérletek és elemzésük.....                                                 | 27 |
| 4.6. Háromszög diagramok és Random Forest elemzés.....                                     | 28 |
| 4.7. Génlisták.....                                                                        | 28 |
| 4.8. RNS izolálás és RT-qPCR.....                                                          | 29 |
| 4.9. RNS szekvenálás.....                                                                  | 31 |
| 5. Eredmények .....                                                                        | 32 |
| 5.1. Az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék kötő régióinak feltérképezése.....                     | 32 |
| 5.2. DNS-motívumok előfordulása az IRF klaszterekben.....                                  | 34 |
| 5.3. A kromatin hozzáférhetősége az IRF klaszterekben.....                                 | 40 |
| 5.4. Az IRF dominancia prediktálása gépi tanulási módszerrel.....                          | 41 |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5. Az IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns régiók és az IRF-ek által szabályozott transzkripciós programok kapcsolatának vizsgálata ..... | 42 |
| 5.6. Az effektor ISG-ek lehetséges szabályozóelemeinek azonosítása.....                                                              | 45 |
| 5.7. Az ISRE és TISRE az effektor ISG-k szabályozó régióiban.....                                                                    | 48 |
| 5.8. A kromatin nyitottság vizsgálata az effektor ISG-k szabályozó elemeiben.....                                                    | 49 |
| 6. Megbeszélés .....                                                                                                                 | 52 |
| 7. Összefoglalás .....                                                                                                               | 55 |
| 8. Summary .....                                                                                                                     | 56 |
| 9. Kulcsszavak .....                                                                                                                 | 57 |
| 10. Köszönetnyilvánítás .....                                                                                                        | 58 |
| 11. Irodalomjegyzék .....                                                                                                            | 59 |
| 12. Függelék .....                                                                                                                   | 72 |

## 1. Rövidítések jegyzéke

|                              |                                                                                                               |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AICE</b>                  | AP1-IRF kompozit elem (AP-1–IRF composite element)                                                            |
| <b>AP1</b>                   | Aktivátor fehérje 1 (Activator protein 1)<br>transzpozázok számára hozzáférhető kromatin régiók azonosítása   |
| <b>ATAC-seq</b>              | szekvenálással kapcsolva (Assay for transposase-accessible chromatin with sequencing)                         |
| <b>CCL5</b>                  | CCL5 kemokin (Chemokine (C-C motif) ligand 5)<br>kromatin immunprecipitáció valós idejű kvantitatív polimeráz |
| <b>ChIP-qPCR</b>             | láncreakcióval kapcsolva (chromatin immunoprecipitation following quantitative polymerase chain reaction)     |
| <b>ChIP-seq</b>              | kromatin immunprecipitáció szekvenálással kapcsolva (chromatin immunoprecipitation following sequencing)      |
| <b>CpG</b>                   | szintetikus CPG-oligonukleotid                                                                                |
| <b>CRE</b>                   | cAMP válaszadó elem (cAMP response element)                                                                   |
| <b>CXCL10</b>                | C-X-C Motif Chemokine Ligand 10                                                                               |
| <b>DBD</b>                   | DNS kötő domén (DNA binding domain)                                                                           |
| <b>DC</b>                    | dendritikus sejt (dendritic cell)                                                                             |
| <b>DNS</b>                   | dezoxiribonukleinsav (deoxyribonucleic acid, DNA)                                                             |
| <b>EICE</b>                  | ETS/IRF kompozit elem (ETS/IRF composite element)                                                             |
| <b>EIRE</b>                  | ETS/IRF válaszadó elem (Ets/IRF response element)                                                             |
| <b>ETS</b>                   | ETS transzkripció faktor (E26 transformation-specific)                                                        |
| <b>Flt3L</b>                 | Fms-szerű tirozinkináz-3 ligand (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand)                                           |
| <b>GAS</b>                   | Interferon gamma aktivációs szekvencia (interferon-gamma activation sequence)                                 |
| <b>GEO</b>                   | Gene Expression Omnibus (adatbázis)                                                                           |
| <b>H3K</b>                   | H3 Hiszton lizinje                                                                                            |
| <b>H4K</b>                   | H4 Hiszton lizinje                                                                                            |
| <b>HOMER</b>                 | Motívum feldúsulás hipergeometrikus optimalizációja (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment)         |
| <b>IAD</b>                   | IRF asszociációs domén (IRF association domain)                                                               |
| <b>IECS</b>                  | IRF-Ets kompozit elem (IRF-Ets composite sequence)                                                            |
| <b>IFN<math>\beta</math></b> | interferon $\beta$                                                                                            |
| <b>IGV</b>                   | Integrative Genomics Viewer (genomböngésző)                                                                   |

|                     |                                                                                            |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IRF</b>          | Interferon reguláló faktor (Interferon regulatory factor)                                  |
| <b>ISG</b>          | IFN-stimulált gén (interferon-stimulated gene)                                             |
| <b>ISGF3</b>        | IFN-stimulált gén faktor 3 (Interferon-stimulated gene factor 3)                           |
| <b>ISRE</b>         | IFN-stimulált válaszadó elem (interferon stimulated response element)                      |
| <b>kb</b>           | kilobázis                                                                                  |
| <b>LDTF</b>         | Sejttípus specifikus transzkripció faktor (lineage determining transcription factor)       |
| <b>LPS</b>          | lipopoliszacharid                                                                          |
| <b>MACS2</b>        | ChIP-seq model alapú elemzése (Model-based Analysis of ChIP-Seq 2)                         |
| <b>MCSF</b>         | makrofág kolóniastimuláló faktor (macrophage colony stimulating factor)                    |
| <b>MHC</b>          | fő hisztokompatibilitási komplex (main histocompatibility complex)                         |
| <b>mRNS</b>         | hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)                                        |
| <b>MutuDC</b>       | „rágsáló tumor” eredetű dendritikus sejtvonal („murine tumor” DC)                          |
| <b>MyD88</b>        | myeloid differentiation primary response protein 88                                        |
| <b>NaDOC</b>        | nátrium-deoxikolát                                                                         |
| <b>NFκB</b>         | NFκB transzkripció faktor (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) |
| <b>NP-40</b>        | nem ionos detergens                                                                        |
| <b>p300</b>         | E1A(humán adenovírus B)-val asszociált 300-kD fehérje (E1A-associated 300-kD protein)      |
| <b>PAMP</b>         | patogén-asszociált molekuláris mintázat (pathogen-associated molecular pattern)            |
| <b>PBM</b>          | Fehérje-kötő microarray (protein binding microarray)                                       |
| <b>pDC</b>          | plazmacitoid dendritikus sejt (plasmacytoid dendritic cell)                                |
| <b>PEST motívum</b> | prolinban, glutaminsavban, szerinben és treoninban gazdag régió                            |
| <b>pIC</b>          | Poliinozin policitidilsav (polyinosinic-polycytidylic acid, polyI:C)                       |
| <b>Pol-II</b>       | RNS polimeráz II                                                                           |
| <b>PRR</b>          | mintázatfelismerő receptor (pattern recognition receptor),                                 |
| <b>PU.1</b>         | PU.1 transzkripció faktor (Purine-rich box-1)                                              |
| <b>PWM</b>          | súlyozott motívum mátrix (position weight matrix)                                          |
| <b>RNA</b>          | ribonukleinsav (ribonucleic acid, RNA)                                                     |
| <b>RNA-seq</b>      | RNS szekvenálás (RNA sequencing)                                                           |
|                     | egy millió feltérképezett leolvasásra vetített leolvasások száma 1000                      |
| <b>RPKM</b>         | bázisonként (Reads Per Kilobase per Million mapped reads)                                  |

|              |                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <b>SRA</b>   | Sequence Read Archive (adatbázis)                                                 |
| <b>SRTF</b>  | stimulus-regulált transzkripció faktor (stimulus-regulated transcription factors) |
| <b>STAT</b>  | STAT transzkripció faktor (Signal Transducer and Activator of Transcription)      |
| <b>TBK1</b>  | TANK-kötő kináz 1 (TANK-binding kinase 1)                                         |
| <b>TF</b>    | transzkripció faktor (transcription factor)                                       |
| <b>TISRE</b> | három egymást követő ISRE félhely (tripartite form of ISRE)                       |
| <b>TLR</b>   | Toll-like receptor                                                                |
| <b>TNFR</b>  | Tumor nekrosis faktor receptor (tumor necrosis factor receptor)                   |
| <b>TRE</b>   | TPA válaszadó elem (TPA-response element)                                         |
| <b>TRIF</b>  | TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN $\beta$                        |
| <b>TSS</b>   | transzkripció start hely (transcription start site)                               |

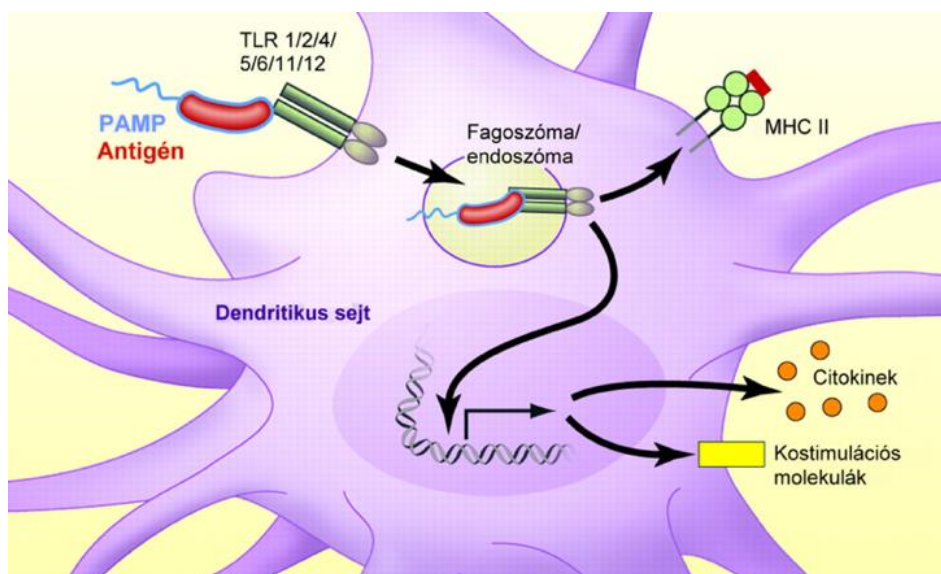
## 2. Bevezetés

### 2.1. A dendritikus sejtek

Zanvil Cohn és Ralph Steinman 1973-ban publikálták megfigyelésüket, miszerint egér lép sejtjei között mikroszkóppal egy addig ismeretlen sejtípust fedeztek fel, amelyet fa formájú nyúlványai után a görög eredetű „dendron” (fa) szóból dendritikus sejtnak (dendritic cell, DC) neveztek el (1). Az azóta eltelt időben számos altípust írtak le, és bebizonyosodott, hogy a DC-k kulcsszerepet játszanak többféle immunválasz kiváltásában és szabályozásában. Eredetük alapján megkülönböztetünk mieloid és limfoid DC-ket. A mieloid DC-k az immunrendszer leghatékonyabb hivatásos antigén-prezentáló sejtjei (1. ábra), résztvesznek immunogén és tolerogén immunválaszok kialakításában (2), míg a plazmacitoid DC-k szerepe elsősorban a vírusellenes immunválasz kialakítása I-es típusú interferon (I-IFN) termelése által. A DC-k aktiválása patogének jelenlétében történik meg, ugyanis olyan mintázatfelismerő receptorokat (PRR) fejeznek ki, amelyekkel detektálják a patogéneken található konzervált struktúrákat (patogén asszociált molekuláris mintázatot(kat), PAMP). A mintázatfelismerő receptorok elsősorban transzmembrán fehérjék, de ismerünk citoplazmikus PRR-okat is. Transzmembrán fehérjék például a Toll-like (Toll-szerű) receptorok (TLR), melyek különböző mikrobiális komponenseket ismernek fel. A kórokozók (baktériumok, vírus és gombák) felvétele és patogén asszociált molekuláris mintázatok felismerése váltja ki a dendritikus sejtek érését. Az érés során megváltozik a morfológiájuk, nő az antigén feldolgozó képességük és a sejt-aktiváló kapacitásuk (3). A patogének antigénjeit a dendritikus sejtek feldolgozzák és a fehérjéket peptidekké darabolják. Ezeket a peptideket prezentálják a T-sejteknek, B-sejteknek és a természetes ölősejteknek (NK-sejtek) a hisztokompatibilitási komplex (MHC) molekulákon keresztül ezzel aktiválva az adaptív immunrendszert (4, 5). Az antigénprezentáció mellett számos egyéb molekulával (pl. kostimulációs molekulák, citokinek, és lipid természetű molekulák) határozzák meg a T-sejtek, B-sejtek és NK-sejtek aktiválásának módját.

### 2.2. A dendritikus sejtek altípusai egérben

Számos dendritikus sejt alpopulációt azonosítottak emberben és egérben (6). Mivel munkánk során egér DC-ekkel dolgoztunk, ezért ebben az alfejezetben az egérben található altípusokat tekintjük át. A különböző DC populációk differenciálódását citokinek és transzkripciós faktorok (TF) szabályozzák (2. ábra). A csontvelőben kezdődik a prekursor DC-k differenciálódása mieloid és limfoid progenitor sejtekből.



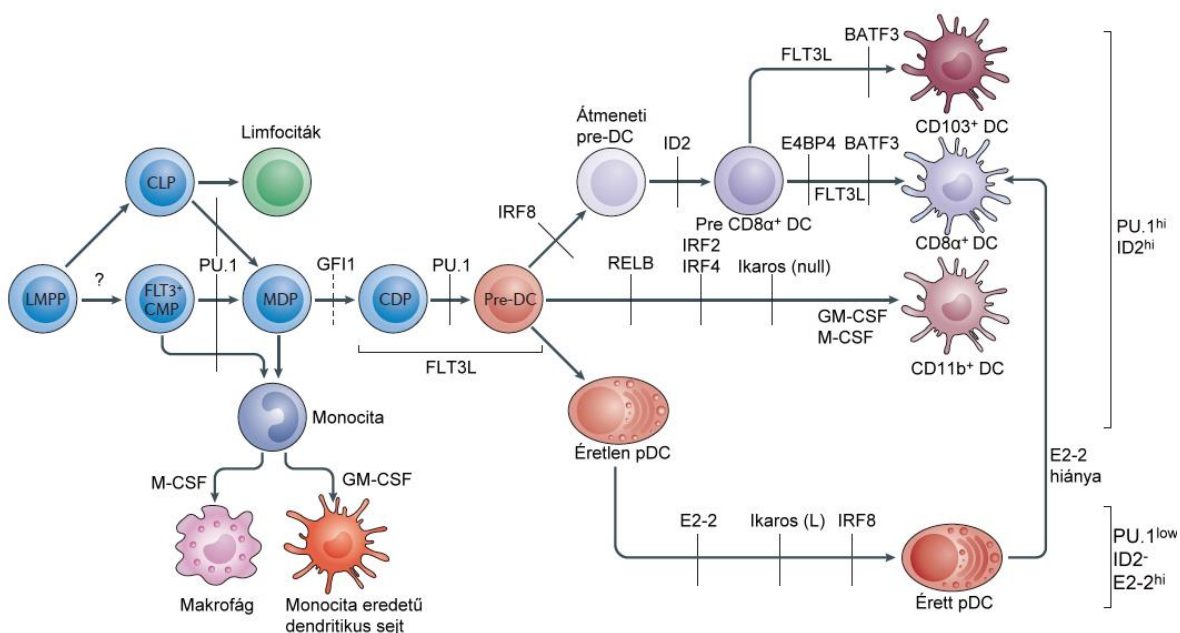
1. ábra: A dendritikus sejtek a TLR-ok által felismert kórokozókat a fagoszómákban internalizálják, ahol a bakteriális antigéneket feldolgozzák, majd az MHC-II molekuláik segítségével prezentálják (ún. „direkt” prezentáció). A bakteriális antigének (piros színnel) és a patogénnel asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) (kék színnel) ugyanabban a fagoszómában vannak jelen. A T-limfociták aktiválásáért és differenciálódásukhoz szükséges kostimuláló molekulák és citokinek indukciójáért is a TLR szignalizáció a felelős. Az ábra a következő publikáció ábrája alapján készült: (7).

Az alfejezetben, a teljesség igénye nélkül, a következő egér DC altípusok működését ismertetjük röviden: (i) plazmacitoid DC, (ii) Langerhans sejt, (iii) monocita eredetű DC (iv) migratórikus CD11c<sup>+</sup> DC, (v) migratórikus CD103<sup>+</sup> DC, (vi) nyirokszövet-rezidens CD4<sup>+</sup> DC, és (vii) nyirokszövet-rezidens CD8<sup>+</sup> DC. Tekintettel arra, hogy munkánk során rezidens CD8<sup>+</sup> DC eredetű sejtvonallal dolgoztunk, ezért ezt az altípust részletesebben tárgyaljuk.

A pDC-k szerepe elsősorban a vírusellenes immunválasz kialakítása és a vírusfertőzés hatására nagy mennyiségű I-IFN termelése (8), de továbbá rendelkeznek antigén prezentáló képességgel is (9). A Langerhans sejtek a bőrszövet epidermiszében helyezkednek el. Érdekes módon, ezt az altípust, amit korábban a DC prototípusának tekintettek, sokan inkább bizonyos tulajdonságaiban DC-kre hasonlító speciális szöveti makrofágoknak tekintik (10). A migratórikus dendritikus sejtekhez hasonlóan az aktivációt és az antigén felvételt követően a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol antigént prezentálnak és stimulus-függő módon szabályozzák a génexpressziót.

A Langerhans sejtek által kiváltott immunválaszok változatosak, képesek immuntoleranciát, gyulladásos, valamint Th17-mediált szabályozó válaszokat indukálni – az antigén, az aktiválás módja és egyéb stimulusok függvényében (11). A monocita eredetű dendritikus sejtek gyulladásos állapotban differenciálódnak a vérben keringő monocitákból. Számos dendritikus sejtekre

jellemző tulajdonsággal rendelkeznek. A monociták makrofág kolóniastimuláló faktor receptort (MCSFR) expresszálnak, amely nélkülözhetetlen a differenciálódásuk szempontjából (12).



2.ábra: Egér dendritikus sejtek differenciálódását szabályozó citokinek és transzkripciós faktorok. A dendritikus sejtek fejlődési útvonalát a csontvelőben található mieloid és limfoid progenitor sejtektől a prekursor dendritikus sejtekig néhány kiemelt alpopuláció esetében (CD8α<sup>+</sup>-, CD103<sup>+</sup>- és CD11b<sup>+</sup> cDC-k és pDC-k). A függőleges vonalak jelzik azokat a pontokat, ahol a kulcs transzkripciós faktorok először aktiválódnak a fejlődési útvonal során. Jelölve vannak azok a szakaszok, ahol az adott növekedési faktorok/citokinek kulcsfontosságú szerepet játszanak. CDP, közös dendritikus elődsejt; CLP, közös limfoid elődsejt; CMP, közös mieloid elődsejt; FLT3L, FLT3 ligand; GF11, növekedési faktor független 1; LMPP, limfoid multipotens elődsejt; MDP, makrofág-dendritikus sejt elődsejt; pre-DC, prekursor dendritikus sejtek; cDC, konvencionális dendritikus sejtek; pDC, plazmacitoid dendritikus sejtek. Az ábra a következő publikáció ábrája alapján készült: (13).

A migratórikus DC-k az antigén feldolgozására és bemutatására specializálódnak, a test különböző szöveteiben megtalálhatóak, antigén felvevő „őrszemként” működnek (13). A különböző alpopulációkat a sejtfelszíni molekulák kifejeződése alapján különböztetjük meg. A migratórikus CD11c<sup>+</sup> és CD103<sup>+</sup> dendritikus sejtek a kórokozók (baktériumok, vírus és gombák) felvétele és patogén asszociált molekuláris mintázatának (PAMP) felismerése után érésen mennek át, mely elindítja migrációjukat a közeli nyirokcsomókba. Az érés során megváltozik a morfológiájuk, nő az antigén feldolgozó képességük és a sejt-aktiváló kapacitásuk (3). Eközben a patogének antigénjeit feldolgozzák és a fehérjéket peptidekké darabolják. Az antigénprezentáció

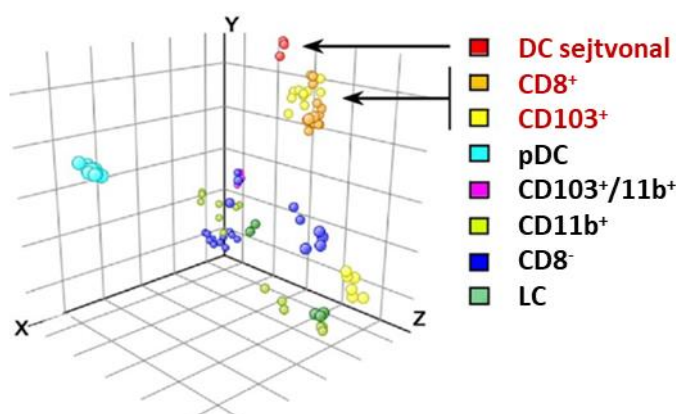
mellett számos egyéb molekulával (pl. kostimulációs molekulák, citokinek, és lipid természetű molekulák) határozzák meg a T-sejtek, B-sejtek és NK-sejtek aktiválásának módját. Az alapvető különbség a migratórikus CD11c<sup>+</sup> DC és a migratórikus CD103<sup>+</sup> DC között az, hogy az előbbiek az antigént MHC-II-n (direkt prezentáció), míg utóbbiak elsősorban MHC-I-n keresztül (keresztprezentáció) mutatják be (4, 5, 14).

A nyirokszövet-rezidens DC-k különböző nyirokszövetekben találhatóak meg, például a lépben, a csecsemőmirigyben és a nyirokcsomókban. A nyirokszövet-rezidens DC-eket a CD4 és CD8 $\alpha$  sejtfelszíni markerek expressziója alapján CD4<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, CD4-CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> alpopulációkra csoportosíthatjuk. A marker CD8<sup>+</sup> sejtfelszíni molekula az MHC-I és a T-sejt receptor közötti interakciót segítő koreceptor (15). A nyirokszövet-rezidens DC-eket a vérben található, illetve a migratórikus DC-k által nyirokszövetekbe szállított PAMP-ok aktiválják, illetve így módon veszik fel a bemutatásra kerülő antigéneket is. Némileg leegyszerűsítve a CD4<sup>+</sup> rezidens DC-k a migratórikus CD11c<sup>+</sup> DC-nek megfelelő altípus, mert az exogén antigéneket elsősorban MHC-II-n mutatják be. A CD103<sup>+</sup> migratórikus DC-khez pedig a CD8<sup>+</sup> sejtek hasonlóak abban a tekintetben, hogy képesek az antigének keresztprezentációjára az MHC-I-membránfehérjéken keresztül (16, 17) Bizonyos mikrokörnyezeti feltételek mellett a CD4<sup>+</sup> és a CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> dendritikus sejtek is képesek a keresztprezentációra, de hatékonyabb az MHC-II-membránfehérjéken történő antigén bemutatásuk a CD4<sup>+</sup> T sejtek felé (18). A CD8<sup>+</sup> DC-k a nyirokszövetekben található prekurzor DC-kből differenciálódnak, fejlődésükhöz kulcsfontosságú citokin az Flt3L (19). Több transzkripciós faktor is nélkülözhetetlen a fejlődésükhöz, ilyen például az PU.1, IRF8 és Batf3 (20). A CD8<sup>+</sup> DC-k alapállapotban segítenek fenntartani a saját szövetekkel szembeni toleranciát. Az éretlen sejtek főként a patogén felismerését és felvételét elősegítő receptorokat fejeznek ki nagy számban. Legfőbb mintázatfelismerő receptorai a TLR-ok (TLR3 és TLR9), és a C-típusú lektin receptorok (CLR) (21). Stimuláció és érés után megnövekedik az MHC és a kostimulációs molekulák expressziója, ilyen például a CD80, CD86, CD40 (22), továbbá nagy mennyiségben termelnek citokineket, pl. IL-12-t és más gyulladásos citokineket. Eközben a felvett antigéneket MHC-I-en keresztül prezentálják (keresztprezentáció), ezért kiemelt szerepük van a citotoxikus CD8<sup>+</sup> T sejtek aktiválásában, és az antivirális immunválasz indukálásában (23).

### 2.3. A MutuDC CD8<sup>+</sup> sejtvonal

A DC-k viszonylag kis mennyiségben fordulnak elő egérben és emberben, izolálás után pedig érzékeny sejtek. Az egér csontvelőből (vagy emberi vérből) lehet prekurzorokat izolálni, de az „in vitro” differenciáltatás több napot vesz igénybe és citokinek használata szükséges hozzá, tehát időigényes és költséges. Ennek kiküszöbölésére Hans Acha-Orbea és munkatársai (Unil, Lausanne, Svájc) egér lépéből származó CD8<sup>+</sup> dendritikus sejtekből létrehoztak egy immortalizált

sejtvonalat (MutuDC1940), amely egy nagy számban kinyerhető, homogén sejtpopuláció (24). Közvetlen összehasonlítás során bizonyították, hogy a MutuDC sejtvonal megtartotta a primer  $CD8^+$  DC fenotípusos és funkcionális tulajdonságait, ideértve a sejtfelszíni markerek expresszióját, a TLR stimulusokra adott válaszkészséget, és keresztprezentáló képességét. A sejtvonalban a TLR9-ligand hatékonyan indukálja az IL-12 p40/p70 szekrécióját, hasonlóan a lépéből izolált  $CD8\alpha^+$  sejtekben (24, 25). A transzkriptomikai elemzés azt mutatta (26), hogy a  $CD8^+$  primer DC-re jellemző markergének expresszálódnak a sejtvonalban (3. ábra). Ezt a sejtvonalat használtuk kísérleteinkhez, így nagyszámú sejtet tudtunk előállítani, melyek homogén populációt alkottak és nem igényelték citokinek jelenlétét fenntartásukhoz.



3.ábra: Egér DC altípusok főkomponens elemzése (PCA) azoknak a géneknek az expressziója alapján, amiket  $CD8^+$  sejtek markereiként azonosítottak az ImmGen projektben. Az elemzés azt mutatta, hogy a Mutu  $CD8^+$  DC sejtvonal együtt klasztereződik a  $CD103^+$  migratorikus DC-vel és a  $CD8^+$  primer sejtekkel, tehát azokhoz hasonlít legjobban az expressziós mintázata. Az ábra a következő publikáció ábrája alapján készült: (26).

## 2.4. A stimulus-regulált transzkripció faktorok (SRTF-ek)

A DC-k a környezetükből érkező szignálokat képesek érzékelni és integrálni, majd ezek alapján megfelelő immunválaszt indukálni. Az immunválasz kiváltása együtt jár azzal, hogy a DC-ben több száz gén expressziója megváltozik. A transzkripció szabályozást olyan transzkripció faktorok (TF-ok) végzik, melyek aktivitását képesek a szignálok módosítani. Ezeket a TF-okat Glass és Natoli nyomán stimulus-regulált transzkripció faktoroknak (stimulus-regulated transcription factor, SRTF) nevezik (27). Makrofágokban a következő családok tagjait szokták SRTF-k közé sorolni: NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT, IRF és bizonyos magreceptorokat (PPAR, LXR, GR) (27). A SRTF-ek kofaktorai a hisztonok és kromatinszerkezet módosításán és egyéb mechanizmusokon keresztül az RNS polimeráz II (Pol-II) aktivitását szabályozzák. Azt, hogy egy sejttípusban az aktivált SRTF egy adott gént milyen mértékben képes szabályozni, alapvetően

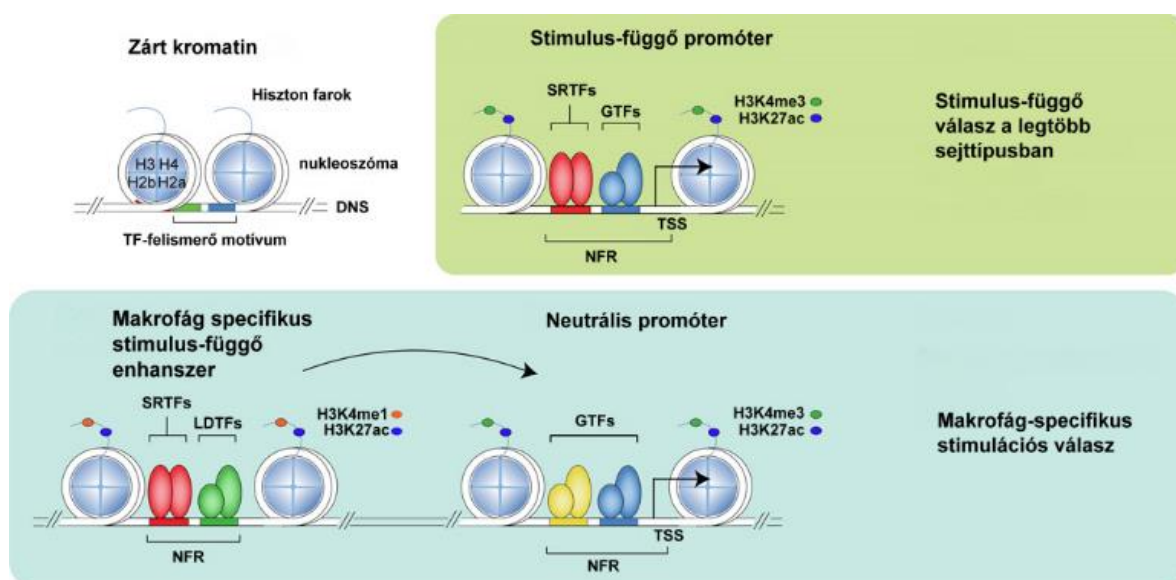
három tényező határozza meg: (i) a specifikus DNS motívumok jelenléte, (ii) a szabályozó elem „használhatósága” és kapcsolata a promóterrel, illetve (iii) egyéb TF-ok kötése.

Az első SRTF-kötést meghatározó tényező a specifikus DNS motívum jelenléte. Egy molekula SRTF DNS-kötő doménje általában egy 4–6 bp hosszúságú DNS szakaszt köt. Az SRTF-ek dimerként vagy trimerként kötnek, ezek teljes felismerőhelye a félhelyek különböző kombinációjából tevődik össze. Az optimális (legnagyobb affinitással kötött) szekvenciát általában kanonikus DNS szekvenciának nevezik. A kanonikus DNS szekvencia jelenléte se nem szükséges, sem nem elégséges feltétele egy adott SRTF kötésének. A kanonikus DNS szekvencia jelenléte azért nem szükséges, mert az SRTF-ek többféle, a kanonikus szekvenciától némileg eltérő szekvenciákat is tudnak kötni, melyeket összegző mátrix-szal (Position weight matrix, PWM) adhatunk meg (28). A kanonikus DNS szekvencia jelenléte pedig azért nem elégséges, mert a kondenzált kromatinszerkezet és a metilált DNS képes gátolni az SRTF-ek kötődését még a kanonikus DNS szekvenciákhoz is.

A második, SRTF-kötést meghatározó tényező tehát a szabályozó elem „használhatósága” (ezt a kromatin nyitottság, hiszton módosítások, DNS metiláltság stb. együttesen határozzák meg) valamint a kromatin 3D szerkezete (enhanszer-promóter kapcsolata). Ezek közül a kromatin nyitottság (vagy hozzáférhetőség) és a hiszton acetiláció a legáltalánosabban vizsgált tényezők, mert a nyitott, nukleoszómamentes kromatin egyértelműen kedvez az SRTF kötésnek, míg az acetilált hisztonok (elsősorban H3 és H4 lizin oldalláncain) az aktív szabályozó régiókkal mutatnak asszociációt (27). A különböző sejttípusokban az aktív vagy aktiválható szabályozó elemek globálisan azonosíthatóak, a kromatin nyitottságot manapság leggyakrabban ATAC-seq-el (Assay for Transposase Accessible Chromatin sequencing) vizsgálják, mellyel a nyitott, transzpozázok számára hozzáférhető kromatin-régiókat azonosítják(29). Ezek a régiók transzkripciósan aktívak és nukleoszómamentesek. Hiszton módosítások genom szintű feltérképezését kromatin immunprecipitációt követő szekvenálással (ChIP-seq) és az adott hiszton módosításra specifikus antitest alkalmazásával végzik. Ez lehetővé teszi a promóterek és enhanszerek, valamint ezen genomi régiók aktív állapotának a globális követését. A hiszton módosításokon kívül a ChIP-seq technológia alkalmas a különböző sejttípusok promóter és enhanszer régióinak a feltérképezésére is. A sejttípus specifikus enhanszer repertoár kialakításáért a sejttípus mester-regulátor TF-jai (angolban „lineage determining TFs”, LDTFs) a felelősek (27). Promoterek esetében egyéb TF-ok is képesek az aktiválhatóság létrehozására. Az LDTF-ek befolyásolják az adott sejttípus kialakulását, a szövetre/sejttípusra jellemző gének expressziójának fenntartását, illetve az enhanszerek nyitottságát (4. ábra). Az SRTF-ek nagyrészt (>70 %) olyan régiókba kötnek, amelyek nyitottak vagy egyéni enhanszer jellegzetességet mutatnak, és csak kisebb részben korábban nem nyitott („látens” vagy „de novo”) régiókba. A nyitottság

kialakításában általában több LDTF és kollaborátor TF együttesen vesz részt (30, 31). Mivel az aktív és aktiválható enhanszer elemek nagy részét LDTF-k hozzák létre, tehát sejtípus függőek, az adott stimulusra kialakuló SRTF-függő válasz nagyrészt szintén sejt-specifikus (31).

A harmadik, SRTF-kötést meghatározó tényező az egyéb TF-ok kötése. Az egyes szabályozó elemek gyakran többféle SRTF kötőhelyét is tartalmazzák, ezzel lehetővé téve az SRTF-ek kötését. A gyulladásos szignálok hatására például, TLR aktiválást követően, több SRTF egyszerre aktiválódik, és sokszor egymás közelében kötnek. Globális módszerek igazolták NF- $\kappa$ B, AP-1 és IRF-ek közös kötődését. Ezek szabályozási „forró-pontoknak” tekinthetők. Ilyen esetekben (részben a SRTF-ek és kofaktorok kölcsönhatásának köszönhetően) az egyes SRTF-ek olyan DNS szekvenciákhoz is kötődnek, amelyek gyenge motívumnak tekinthetők.



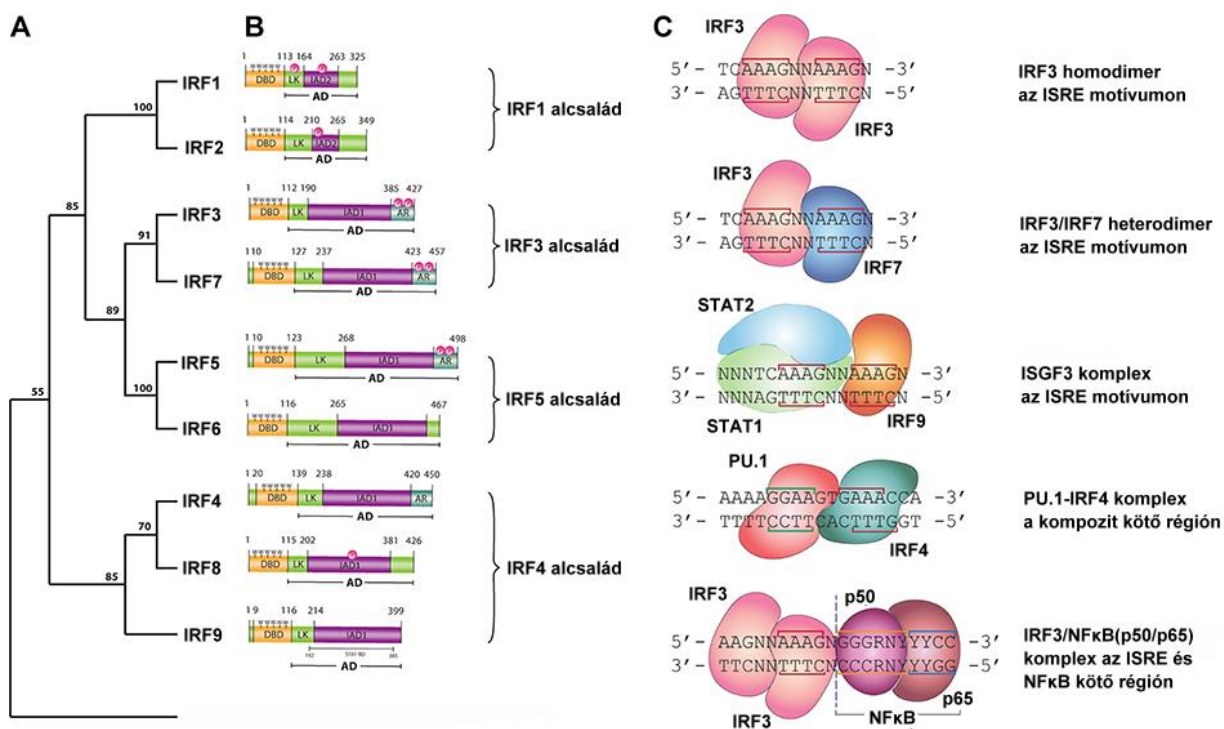
4.ábra: Az SRTF-ek és az LDTF-ek kölcsönhatása a génexpresszió szabályozásában a makrofágokban. A zárt kromatinban található TF-felismerő motívumot általában nem képesek kötni az SRTF-ek (balra fent). Az SRTF-ek a stimulus-függő promóterekhez (jobbra fent) és az enhanszerekhez (lent) való kötődésükkel aktiváló vagy represszáló transzkripciós válaszokat váltanak ki. Az általános TF-ok (GTF-ek) és LDTF-ek átrendezik a nukleoszmákat, mintegy kijelölik, aktiválható állapotba hozzák azokat. Az SRTF-ek kötődése ezekhez az aktiválható promóterekhez és enhanszerekhez, elősegíti a koaktivátorok toborzását. Egy SRTF kötődése egy olyan promóterhez, amely sok sejtípusban nyitott, általános választ eredményez (jobbra fent). Az SRTF kötődése a sejt-specifikus enhanszerhez sejt-specifikus szabályozását eredményezi (lent). GTF, általános transzkripciós faktor; TSS, transzkripciós starthely; NFR, nukleoszmamentes régió. Az ábra a következő publikáció ábrája alapján készült: (31).

## 2.5. Az IRF transzkripciós faktorok

Az Interferon reguláló faktor család tagjai az I-IFN-ok indukálása mellett kiemelt szerepet játszanak a sejten belüli antivirális válasz kialakításában, a gyulladásos immunválaszokban, és bizonyos sejttípusok differenciálódásában (32, 33). Az IRF-ek kiesése vagy funkciójuk megváltozása specifikus immunválaszok hiányához vagy onkogenezishez vezethet, illetve olyan autoimmun betegségekkel hozható kapcsolatba, mint például a gyulladásos bélbetegség, a szisztémás lupus erythematosus és a rheumatoid arthritis (32, 34). Az IRF család emberben és egérben 9 fehérjét tartalmaz: ezeket 1-9 sorszámmal jelölik (35). Az IRF család tagjai eltérést mutatnak szöveti kifejeződés, aktiválás, dimerizáció és komplexképzés, illetve a szabályozott transzkripciós programok szempontjából.

### 2.5.1. Az IRF-fehérjék szerkezete

Az IRF-fehérjék alapvető szerkezeti elemei az N-terminális DNS-kötő domén (DNA binding domain, DBD) és a C-terminális asszociációs domén (IRF association domain, IAD), ezek között található az összekapcsoló „linker” régió (linker, LK) (36) (5. ábra). Ezeken túl tartalmazhatnak még kevésbé konzervált szignál-érzékeny domént (signal response domain, SRD), apoptózis aktivációs domént (AAD) és gátló domént (inhibitory domain, ID vagy autoinhibitory domain AR) (37). A DBD által felismert DNS szekvencia az 5'-GAAA-3' tetranukleotid, amelyből a kanonikus IFN-stimulált válaszadó elem (ISRE, 5'-GAAANNGAAA-3') kettő található (35, 38–41). Az IAD felelős más TF-ral történő kölcsönhatás kialakításáért. Egyes IRF-fehérjék, mint például az IRF1, IRF3 és az IRF7 homo- vagy heterodimerket képez IRF-ekkel.



5. ábra: Az IRF transzkripciós faktorok doménszerkezete és kötése. (A) Az IRF család fehérjéinek DNS-kötő doménjének filogenetikai fája. (B) A humán IRF fehérjék funkcionális doménjei. DBD, DNS-kötő domén; AD, aktivációs domén; LK, linker régió; IAD, IRF asszociációs domén; AR, autoinhibitor domén. (C) Az IRF fehérjék DNS-kötése. A jelölt nukleotidok kerülnek interakcióba az IRF fehérjék DNS kötő doménjével. N, bármilyen nukleotid; R purin; Y, pirimidin. Az ábra a következő publikáció ábrája alapján készült: (36)

Vannak IRF-k (IRF4, IRF8 és IRF9), amelyek más családba tartozó TF-ral lépnek kapcsolatba és azokkal alkotott dimerként vagy trimerként kötődnek a DNS-hez. Azok a TF-ok, amelyeket az IRF4 és IRF8 partnereként írtak le, például a PU.1 rendelkezik ún. PEST motívummal (prolinban, glutaminsavban, szerinben és treoninban gazdag régió), amely elősegíti az IAD doménnel való hatékony asszociációt (42–44). A STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1) és STAT2 (Signal transducer and activator of transcription 2) TF-okkal alkot heterotrimert az IRF9, így léterhozva az ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3) komplexet (45, 46). A poszttranszlációs módosítások szabályozzák az IRF-fehérjék aktivitását és a közöttük lévő kölcsönhatásokat (47).

## 2.5.2. AZ IRF-ek által felismert DNS motívumok

Ebben az alfejezetben azokat a DNS szekvenciákat és motívumokat tekintjük át, amelyekhez IRF-ek kötődnek. Mindegyik szekvencia tartalmaz legalább egy IRF-kötő félhelyet (5'-GAAA-3'), de ezen túl nagy változatosság figyelhető meg (1. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy az irodalomban a DNS (felismerő) szekvencia és DNS motívum kifejezéseket gyakran

egymás mellett vagy felcserélhető fogalmakként használják. A félreérthetőség elkerülése érdekében „kanonikus szekvenciának” nevezzük azokat a szekvenciákat, ahol minden pozícióban csak egy bázis van megadva. (Természetesen az IRF-ek a felsorolt szekvenciák reverz komplementjét is kötik.)

### *ISRE és TISRE*

Az eredeti konszenzus ISRE-t (12-15 bp, néhány I-IFN-stimulált génből) a következőképpen határozták meg: YAGTTTC(A/T)YTTYCC és AGTTTCNNTTTCNC/T (39, 48). Ezek a jelenlegi fogalmaink szerint tehát az ISGF3 kötőhelyei. Eredetileg egy másik kifejezést „IRF-kötőhely” (eredetiben „IRF-binding site”) használtak az IRF-dimerek DNS-motívumainak leírására (34). Mivel az ISRE és az „IRF-kötőhely” szekvencia nagymértékben átfedi egymást, sok szerző már nem használja az „IRF-kötőhely” (illetve az ezzel rokonértelmű IRF-E) kifejezést, és az ISRE-re az eredeti (hosszabb) ISRE és IRF-kötőhely közös bázisaira (GAAANNGAAA) hivatkoznak. A 10 bp hosszú ISRE-re (GAAANNGAAA) a kanonikus ISRE szekvencia. Az egyes IRF-eknek lehet preferenciája az ISRE-n túlnyúló 5' és 3' pozícióban lévő bázisok tekintetében. A lehetséges kötőhelyek összessége sokszor nehézkesen adható meg betűkóddal, ezeket olyan motívum logóval szokták megjeleníteni, ami a PWM alapján készül. Az 5'-GAAA-3' szekvencia 3-4 tandem ismétlődésének jelenlétét számos effektor ISG (interferon-stimulated gene, IFN-stimulált gén) szabályozó elemében dokumentálták (41). A három egymást követő ISRE-félhelyet (továbbiakban: tripartite ISRE, TISRE) az IRF1, IRF2 és az IRF8 fehérjék kötőhelyeként azonosították (41, 49, 50). Jelenleg nem rendelkezünk pontos ismeretekkel, hogy az IRF-ek milyen konfigurációban kötik a TISRE-t. Tekintettel arra a tényre, hogy a TISRE nem egy különálló motívum, a TISRE-k listája az összes ISRE-k listájának részhalmazát képviselik genom szinten.

### *EICE, EIRE, IECS és AICE*

Az IRF4 és IRF8 fehérjék kötőhelyeként azonosítottak egy 10 bázis hosszú ETS-IRF kompozit elemet (ETS-IRF composite element, EICE, 5'-GGAANNGAAA-3') azon gének promóter régióiban, amelyek alapvető fontosságúak a makrofágok és a B-sejtek működéséhez. Az EICE egyik feléhez (GAAA) IRF4 vagy IRF8 kapcsolódik, míg a másik feléhez (GGAA) az ETS (E26 transformation-specific vagy Erythroblast Transformation Specific) TF kötődik (44). Az EICE motívumhoz hasonlóan az IRF4/8-PU.1 komplex kötődhet egy 11 bázis hosszú ETS-IRF válaszadó elemhez is (ETS-IRF response element, EIRE, 5'-GGAANNNGAAA-3'), amely 3 bázis távközzel rendelkezik (42, 51). Egy alternatív és kevésbé gyakori elem az IRF-ETS kompozit szekvencia (IECS, 5'-GAAANN(N)GGAA-3'), melyben az ETS és IRF kötőhelyek fordított sorrendben helyezkednek el 2 vagy 3 bázis távközzel (52). A T-sejtekben (ahol alacsony a PU.1

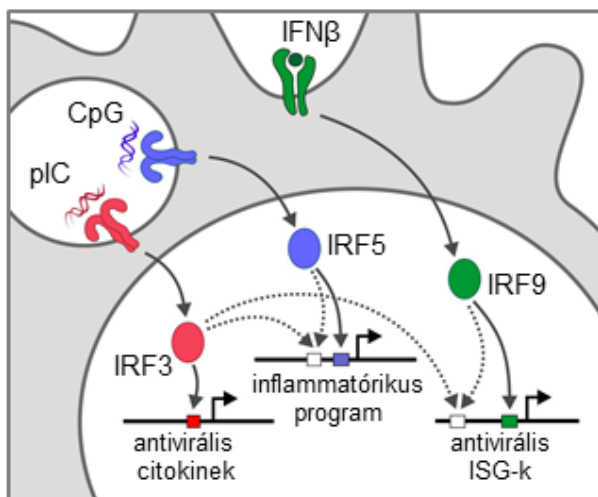
szint) az IRF4 nem EICE-hez kötődik, hanem un. AP-1-IRF kompozit elemhez (AP-1-IRF composite element, AICE), mely IRF4 és AP-1 TF-ok közös kötőhelyeként szolgál (53). Az AICE-t eredetileg TGAnTCA/GAAA szekvenciaként írták le, az AP1- és az IRF elemek közvetlenül vagy 4 bp távközzel illeszkednek (53). Hamarosan több munkacsoport különböző sejttípusokban azonosította az AICE-t, mint IRF4 vagy IRF8 és AP-1 TF-ok (BATF, JUN) kötőhelyét. Az AICE többféle kombinációjú AP-1-IRF elem összefoglaló neve (54–57).

*1. táblázat: IRF-fehérjék által felismert DNS szekvenciák.*

| Motívum | kanonikus DNS szekvencia<br>(IRF-kötő félhelyek kövérrel jelölve) | Motivumot kötő TF-ok   |
|---------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|
| ISRE    | 5'-GAAANNGAAA-3'                                                  | IRF dimerek és ISGF3   |
| TISRE   | 5'-GAAANNGAAANNGAAA-3'                                            | IRF dimerek és ISGF3   |
| EICE    | 5'-GGAANNGAAA -3'                                                 | PU.1 és IRF4 vagy IRF8 |
| EIRE    | 5'-GGAANNNGAAA -3'                                                | PU.1 és IRF4 vagy IRF8 |
| IECS    | 5'-GAAANN(N)GGAA-3'                                               | IRF4 vagy IRF8 és PU.1 |
| AICE    | 5'-TGANTCA/GAAA-5' és mások                                       | AP-1 és IRF4 vagy IRF8 |

### **2.5.3. IRF3, IRF5 és IRF9 és az általuk szabályozott transzkripció programok**

Az IRF-ek általános ismertetése után a következő három alfejezetben részletesebben foglalkozunk azzal a három IRF-rel, amelyeket a disszertációban tárgyalt kísérleteink során vizsgáltunk. Az IRF3, IRF5 és IRF9 magas szinten fejeződnek ki egér CD8<sup>+</sup> DC-ben, és kiemelt szerepük van immunfolyamatok szabályozásában. Áttekintjük, hogy milyen szignálok aktiválják ezeket az IRF-eket, milyen partnerekkel kötnek, és milyen génexpressziós programokat szabályoznak. A következő IRF-ekhez kapcsolódó transzkripció programok kerülnek ismertetésre: IRF3 és az antivirális citokinek, az IRF5 és a gyulladásos program, valamint a IRF9 és az antivirális ISG-k (6. ábra). Fontos megemlíteni, hogy az IRF3, IRF5 és IRF9 részt vesznek egyéb, itt nem tárgyalt programokban, illetve az itt tárgyalt gének szabályozásában más TF-ok is részt vehetnek.



6. ábra: A munkacsoport által tanulmányozott IRF-ek által szabályozott programok. A pIC ligand (pirossal) a TLR3-hoz kötődik, ami TRIF-függő szignalizáción keresztül aktiválja az IRF3-t, ami indukálja az antivirális citokinek transzkripcióját. A CpG ligand (kékekkel) a TLR9-hez kötődik, ami MYD88-függő szignalizáción keresztül aktiválja az IRF5-t, ami indukálja a gyulladásos programhoz tartozó gének transzkripcióját. Az I-IFN-ek (zölddel) I-IFN receptorhoz kötődve aktiválják az ISGF3 komplexet (IRF9-STAT1-STAT2). A komplex az antivirális interferon-stimulált géneket (ISG) indukálja. Ezeket a programokat a többi IRF is képes kisebb mértékben szabályozni (szaggatott vonalak). Az egyszerűség kedvéért a szignalizáció és közreműködő egyéb TF-ok nincsenek feltüntetve. Forrás: Széles Lajos korábbi publikációiban még nem szereplő ábrája.

### 2.5.3.1. IRF3 és az antivirális citokinek

A TLR3 és a TLR4 jelátviteli útvonalak az IRF3 aktiválásához vezetnek(58, 59). A TLR-en kívül az RLR szignalizáció is aktiválja az IRF3-t (60). Az aktiválását két rokon protein-kináz, az I $\kappa$ B kináz  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) és a TANK-kötő kináz 1 (TBK1) szabályozza, amelyek a Ser396 oldalláncon foszforilálják az IRF3 fehérjét, és így elősegítik a fehérje dimerizációját és a nukleáris transzlokációját (61–63). Az IRF3 homodimert, vagy más IRF-ekkel heterodimert (pl. IRF3/IRF7) alkot.

A foszforilált IRF3 a sejtmagba transzlokálódik, ahol többek között antivirális citokinek kódoló géneket aktivál, például *Ifnb1*, *Cxcl10* és *Ccl5* (33, 58, 64). Az antivirális citokinek és kemokinek elősegítik a kemotaxist, az NK és CD8<sup>+</sup> T sejtek kialakulását és homeosztázisát. Az IFN $\beta$  (Interferon Beta 1) részt vesz az antivirális válaszok kiváltásában, az ISG-k indukcióján keresztül a sejtek antivirális állapotának kulcsfontosságú aktivátora (ld. alább). Az IFN $\beta$  hozzájárul a citotoxikus T-limfociták (CTL) és az NK sejtek aktiválásához, valamint a DC-k éréséhez (65, 66). A CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5) a monociták, memória T-sejtek és

eozinofil granulociták kemotaxisát indukálja (67). A CXCL10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10) részt vesz a kemotaxisban, vírusfertőzések során aktiválja az immunsejteket. Fontos szerepet játszik az apoptózisban, a differenciálódásban és a sejtnövekedés szabályozásában (68)

### **2.5.3.2. Az IRF5 és a gyulladásos program**

Az IRF5 aktiválását a MYD88-on keresztül történő TLR szignalizáció szabályozza a Ser158 és Ser309 oldalláncok foszforilációján keresztül TBK1 által (69, 70). Az IRF5 fehérje az inflammatorikus válaszok kialakulásában játszik fontos szerepet, ezt bizonyítja, hogy az *Irf5*-hiányos egerekben csökken a gyulladásos citokinek termelése, pl.: IL12, TNF (71, 72).

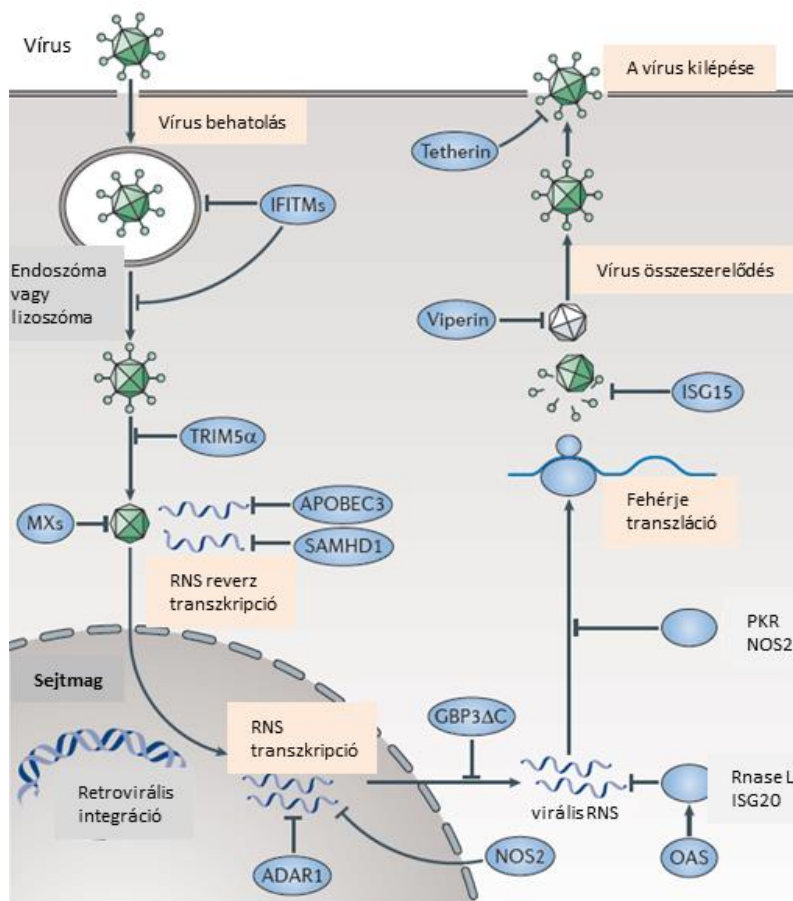
A gyulladásos citokineket (TNF, IL-12, EBI3) kódoló gének képezik a TLR-indukált gyulladásos programok alapját a makrofágokban és a dendritikus sejtekben. Ezek többféle funkcióval bírnak, a szisztémás gyulladás mediációjától kezdve a T-sejt válaszok kialakításáig lokálisan. A gyulladásos citokineket kódoló gének számos más, különböző funkciójú génekkel együtt aktiválódnak, szabályozódnak. Ezeknek a géneknek az aktiválását, amelyet egy adott gyulladásos stimulus aktivál „gyulladásos programnak” nevezik. Az *Il12b* (Interleukin 12B) két citokin molekula (IL-12 és IL-23) alegységét kódolja. Az IL-12-nek fontos szerepe van az NK-sejtek és a citotoxikus effektorsejtek aktiválásában és az antigénspecifikus adaptív immunválasz elindításában egyaránt. Az antigén-prezentáló sejtek által termelt IL-12 Th1 irányba tolja el a CD4<sup>+</sup> T-sejtek differenciálódását az aktivációt követően (73). A *Tnf* (Tumor Necrosis Factor) gén egy gyulladást serkentő citokint (TNF $\alpha$ ) kódol, amely szisztémás gyulladásos válasz szabályozásában játszik fontos szerepet. Elsősorban makrofágok termelik, majd hatását a legtöbb sejten megtalálható TNFR (tumor necrosis factor receptor) receptorokhoz való kötődéssel feje ki. Bizonyos körülmények között stimulálja a sejtek proliferációját és indukálja a sejtek differenciálódását (74). Az EBI3 (Epstein-Barr Virus Induced 3) az IL27 fehérjével asszociálva IL-27 interleukint képez, amely egy pro- és anti-inflammatorikus tulajdonságokkal rendelkező heterodimer citokin (75).

### **2.5.3.3. Az IRF9 és az antivirális interferon-stimulált gének**

Az I-IFN-ok egy heterodimer receptor komplexhez kötődnek, amely az IFN- $\alpha$  receptor 1 (IFNAR1) és IFNAR2 alegységekből áll. Az I-IFN jelátvitel a STAT1 és a STAT2 fehérjék foszforilációjához, heterodimerizációhoz és az IRF9 fehérjével történő kölcsönhatáshoz vezet, ami az ISGF3 komplexet képezi (33, 45). Az ISGF3 a sejtmagban ISRE elemeket köti, és ezáltal az interferon-stimulált gének (ISG-k) transzkripcióját eredményezi (76–78). Az IRF9 fehérje IRF-asszociációs doménjében (IAD) nincs autoinhibitív elem, azaz a stimulus által indukált IRF9 foszforiláció valószínűleg nem szükséges feltétel az IRF9 és STAT fehérjék asszociációjához (79,

80). Egy közelmúltban megjelent tanulmány megkérdőjelezi az ISGF3 citoplazmában történő összeszerelődésének hagyományosan elfogadott modelljét, és ChIP-seq adatok alapján felveti, hogy az ISGF3 komplex-formációja a DNS-en történik (81). Az ismertetett útvonalon kívül az I-IFN-ek indukálják a nem kanonikus JAK/STAT jelátvitelt is (82). Az ISGF3 mellett az IRF9-fehérjét és csak egyféle STAT1 vagy STAT2 fehérjét tartalmazó komplexek szintén szabályozzák a génexpressziót (81, 82). Említésre méltó, hogy a III-IFN-ekkel is aktiválható az ISGF3, és az antivirális állapot („antiviral state”) is indukálható ezekkel (83). Az ISGF3 kötődése az ISRE-hez kofaktorok toborzásához és végső soron a szabályozott ISG-k promoterén az RNS polimeráz II fokozott aktiválásához vezet (84–87).

Az ISG-k által kódolt fehérjék sokrétű szerepet játszanak. Számos effektor ISG fontos szerepet játszik a vírusok, baktériumok vagy paraziták által okozott fertőzések leküzdésében, ugyanis képesek közvetlenül gátolni a patogének életsiklusát (7.ábra). A kemokinek és a kemokin receptorok szabályozása lehetővé teszi a sejtek közötti kommunikációt, a negatív regulátorok segítik az IFN által indukált állapot befejezését és elősegítik a celluláris homeosztázis visszaállítását. További ISG-k proapoptotikus fehérjéket kódolnak, melyek bizonyos körülmények között sejthalálhoz vezetnek. Az effektor ISG-k az antivirális állapot kialakításában vesznek részt a vírus replikáció közvetlen gátlásával (88–92). A teljesség igénye nélkül néhány effektor ISG funkcióját az alábbiakban ismertetjük három összefoglaló cikk alapján (90, 91, 93). Az IFITM (IFN-induced transmembrane) fehérjék gátolják a vírusok széles spektrumának endocitikus fúzióját. TRIM5 $\alpha$  (Tripartite motif protein 5 $\alpha$ ) gátolja a HIV-1 és más vírusok RNS-ének kiszabadulását a kapszid burokból. Az Mx1 (myxoma resistance protein 1) a vírusok széles skáláját gátolja azáltal, hogy gátolja a bejövő vírusrészecskék endocitikus mozgását és a ribonukleokapszidból való kiszabadulását. Az OAS (2,5-oligoadenylate synthetase) és a PKR (protein kinase R) fehérjék gátolják a vírusokat az mRNS lebontásával és az mRNS-ek transzlációjának gátlásával. A Bst2 (Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2, más néven *Tetherin*) gén által kódolt fehérje hatékonyan gátolja a virionok felszabadulását, azáltal, hogy közvetlenül a fertőzött sejtek membránjához és egymáshoz köti őket. A megkötött virionok endocitózissal internalizációt követően lebomlanak, vagy a sejmembránon maradhatnak, ezáltal a virionok terjedése gátlódik (90, 91, 93).



7. ábra: Az effektor ISG-k szerepe az antivirális immunitásban. Az I-IFN-ok által indukált effektor ISG fehérjék (kék ellipszisekben) számos, vírusok replikációs ciklusához kapcsolódó molekuláris eseményt (sárga téglalapokban) képesek gátolni. Az IFN-indukálható effektor ISG-k a virusreplikáció szinte minden szakaszában közreműködnek és együttesen hozzák létre az ún. antivirális állapotot. Forrás: (91).

### 3. Célkitűzés

A disszertációban ismertetett kísérletek két összefüggő témakörhöz tartoznak, melyek két tudományos közleményben kerültek publikálásra (ld. függelék). A témavezetőm korábbi tanulmányaiban vizsgálta az IRF-ek szerepét a TLR-indukált transzkripciós programokban. Ezek során elvégzett ChIP-seq kísérletek azt mutatták, hogy az IRF-ek kötőhelyei jelentősen különböznek. Ez alapján fogalmaztuk meg az első témakör célkitűzéseit. Az első témakörben azt vizsgáltuk, hogy hogyan valósul meg, hogy a különböző IRF-ek eltérő felismerő-helyekre kötődnek és miért képesek eltérő transzkripciós programokat szabályozni. Mivel a transzkripciós programok gyakran bizonyos sejttípusokra vannak korlátozva, így érdekes kérdésként merült fel, hogy hogyan lehetséges, hogy az I-IFN-ok számos sejtben jelentősen átfedő géneket képes szabályozni. A második témakör alapkérdése tehát az volt, hogy milyen (epi)genetikai jellemzői vannak az effektor ISG-knek, amik lehetővé teszik, hogy az I-IFN-ok számos sejtben, nagymértékben indukálódjanak. Mindkét témakör kérdéseinek megválaszolásához olyan globális módszereket alkalmaztunk, mint a ChIP-seq, ATAC-seq, és az RNA-seq, valamint bioinformatikai módszereket használtunk az adatok kielemezéséhez.

#### 3.1. IRF3-, IRF5- és IRF9-specifikus kötőhelyek azonosítása és jellemzése

- Az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék kötőhelyeinek feltérképezése a teljes genomban ChIP-seq felhasználásával.
- Azon régiók azonosítása, ahol jelentős különbség van az IRF3, IRF5 és IRF9 kötésében (IRF3-, IRF5- és IRF9-specifikus kötőhelyek).
- A IRF3, IRF5 és IRF9-specifikus kötőhelyek jellemzése a következő tulajdonságok alapján: ISRE motívum, ISRE 5' és 3' túlnyúló bázisok, a társfaktorok kötése és a kromatin nyitottsága.

A IRF3-, IRF5- és IRF9-specifikus kötőhelyek és transzkripciós programok kapcsolatának vizsgálata.

#### 3.2. Az effektor ISG-k szabályozó régióinak azonosítása és jellemzése

- Az I-IFN-indukált effektor ISG-k és lehetséges szabályozó régiók azonosítása RNA-seq és IRF9 ChIP-seq segítségével.
- Az effektor ISG-k szabályozó régióiban található DNS kötő motívumainak azonosítása.
- A kromatin nyitottságának vizsgálata az effektor ISG-k szabályozó régióiban DC-ben és egyéb immunsejtekben.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Sejtenyésztés, ligandkezelés

A CD8<sup>+</sup> dendritikus sejt vonal (MutuDC1940) Prof. Hans Acha-Orbea laboratóriumából származik (Unil, Lausanne, Svájc, (24)). A sejteket 10% (v/v) hőinaktivált marha szérum (FBS Good, EU approved, filtrated bovine serum, Virus and mycoplasma tested, PAN Biotech), 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml sztreptomycin antibiotikum (Penicillin-Streptomycin, Sigma Aldrich) és 50 µM β-merkaptotanol (Thermo Fisher Scientific) tartalmú tápoldatban (Gibco Iscove's Modified Dulbecco's Medium IMDM, GlutaMAX™ Supplement, Thermo Fisher Scientific) letapadó sejtekhez megfelelő T75 és T175 sejtenyésztő flaskában, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében tenyésztettük. A médium nem tartalmazott hozzáadott növekedési faktorokat. A passzálás során a sejteket 1mM EDTA tartalmú fiziológiás sóoldatban inkubáltuk 4 percre, majd médiummal hígítva 6 percre centrifugáltuk 600 rpm fordulatszámon. A felülúszó leöntése után a sejteket friss tápoldatban tenyésztettük tovább a következő passzálásig illetve a ligand kezelésig.

Megfelelő sejtszámból (10-20 millió sejt/minta) kiindulva a sejteket különböző TLR ligandokkal és IFNβ liganddal kezeltük. TLR9 aktiválás esetében 1 mM CpG liganddal (Class B CpG oligonucleotide - Murine TLR9 agonist, Invivogen) kezeltük a sejteket, mely egy szintetikus CPG-oligonukleotid. Bizonyos metilálatlan CPG motívumok számos patogénben sokkal gyakrabban fordulnak elő, mint emlősökben. TLR3 aktiválás esetében 5 µg/ml Poly (I:C) liganddal (Polyinosine-polycytidylic acid High molecular weight - TLR3 agonist, Invivogen) kezeltük a sejteket, mely egy szintetikus RNS analóg. Az RNS vírusok genomja, ill. bizonyos vírusok replikációs intermedierei dupla szálú RNS-e. Az IFNα/β (IFNAR) receptor aktiválása esetében 100 U/ml IFNβ liganddal (Interferon-β Protein, Recombinant mouse, Merck) kezeltük a sejteket, mely az IFNβ citokinnel ekvivalens rekombináns fehérje. A ChIP-seq és ChIP-qPCR kísérletekhez a CD8<sup>+</sup> sejteket 90 percre kezeltük az adott ligandokkal. A ChIP-qPCR kísérletek esetében kombinált kezeléseket is alkalmaztunk. Génexpressziós qPCR mérések esetében a kezelések időtartama 1,5, 3, 6 és 12 óra volt. Megjegyzés: A disszertációban tárgyalt kísérleteknél a sejtenyésztési munkákat a szerző végezte el.

### 4.2. ChIP-seq és ChIP-qPCR (kromatin immunprecipitáció szekvenálással kapcsolva és kromatin immunprecipitáció valós idejű kvantitatív PCR-rel kapcsolva)

A ChIP-seq technika segítségével az általunk kiválasztott transzkripciós faktorok kötését detektáljuk újgenerációs szekvenálással kapcsolva genom-szinten. A ChIP-qPCR módszerrel az általunk kiválasztott transzkripciós faktorok kötését detektáljuk valós idejű kvantitatív PCR-rel.

A kettős keresztkötés előtt a sejtekről eltávolítottuk a tápoldatot, majd 2 mM-os koncentrációban hígítva a DSG-t (Disuccinimidyl glutarate, DSG Crosslinker 100 mg, ProteoChem) PBS-ben 40 percig inkubáltuk a sejteket. A DSG egy homobifunkcionális térhálósító reagens és a DNS-fehérje kötő kölcsönhatásokat tudjuk vele meghatározni. A második keresztkötés előtt eltávolítottuk a DSG oldatot a sejtekről és 1%-os koncentrációban hígítva formaldehidet (Pierce, Methanol-free Formaldehyde Ampules, Thermo Scientific) adtunk a sejtekhez, majd 10 percig inkubáltuk. Ezután a keresztkötést 125 mM végső koncentrációban glicint tartalmazó PBS oldattal leállítottuk. A sejteket PBS-el mostuk, felkapartuk majd 12000 g fordulatszámon centrifugáltuk. Centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk és a keresztkötött sejtpelletet folyékony nitrogénben fagyasztottuk majd -70°C-on tároltuk az immunprecipitációig.

A kromatin immunprecipitációhoz az adott fehérje elleni megfelelő antitestek kiválasztása, optimalizálása szükséges. Vizsgálatainkhoz az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjékre specifikus antitesteket előzetes ChIP-qPCR mérésekkel teszteltük, majd mindhárom IRF fehérjére kiválasztottuk a legmegfelelőbb antitestet, amellyel elvégeztük a szekvenálást és a kombinált kezelések esetében a ChIP-qPCR méréseket.

Első lépésként elkészítettük a szükséges oldatokat és puffereket:

- PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4);
- 0,5 M EDTA, pH 8;
- 1 M Tris pH 8;
- 1 M Tris pH 7;
- 5 m/m% NaDOC;
- 20 m/m% SDS
- 5 M NaCl
- ChIP lízis puffer: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris pH 8, 1 v/v% Triton X-100, 0,1 m/v% SDS, proteáz inhibitor (cOmplete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche),
- mosó puffer I. 1 v/v% Triton X-100, 0,1 m/v% SDS, 0,1 m/v% nátrium-deoxikolát, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris pH 8, proteáz inhibitor
- mosó puffer II. 1 v/v% Triton X-100, 0,1 m/v% SDS, 0,1 m/v% nátrium-deoxikolát, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris pH 8, proteáz inhibitor
- mosó puffer III. 0,5 v/v% NP-40, 0,5 m/v% nátrium-deoxikolát, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris pH 8, proteáz inhibitor
- mosó puffer IV. TE puffer: 10 mM EDTA pH, 200 mM Tris pH
- eluáló puffer: 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 m/v% SDS

A keresztkötött és fagyasztott sejteken sejtlízist és sejtmaglízist végeztünk proteáz inhibitor tartalmazó ChIP lízis pufferrel. A keresztkötött és fagyasztott sejteket felszuszpendáltuk

1 ml lízis pufferben. 12000 g fordulatszámon 4°C-on 1 percig centrifugáltuk a sejteket és a felülúszót eltávolítottuk majd ezt a lépést megismételtük még kétszer. A harmadik centrifugálás után felvettük a sejteket 1 ml ChIP lízis pufferben.

Ezután szonikálással (Diagenode Bioruptor Standard) 4°C-on 5 cikluson keresztül 30 perc ON és 30 perc OFF funkcióval 100-2000 bp nagyságú szakaszokra fragmentáltuk a DNS-t. A kromatin immunprecipitációhoz a következő antitesteket használtuk: IRF3 (D83B9, Cell Signaling), IRF5 (ab21689, Abcam), IRF9 (AF5629, R&D Systems), STAT2 (07-140, Merck Millipore), STAT1 (sc-346, Santa Cruz Biotechnology), RNAPII-pS5 (ab5131, Abcam). Ennél a lépésnél 50 µl kromatint elteszünk -20°C-ra háromszoros térfogatú abszolút etanolban, később ezeket a mintákat használjuk a ChIP-qPCR kísérletekhez ún. „input” azaz kiindulási mintaként.

Az immunprecipitációt követően négy mosási lépésben mágneses tisztítással (Dynabeads Protein A/G for Immunoprecipitation, Thermo Scientific) azok a DNS fragmentek maradtak, amelyekhez az általunk vizsgált fehérje kötődik, illetve az arra specifikus antitest kötődött. Az DNS fragmenteket eluáló pufferrel eluáltuk a mágneses gyöngyökről. A keresztkötéseket 200 mM-os koncentrációban hígítva NaCl hozzáadásával, 65°C-os 12 órás inkubálással oldottuk fel. Ezután a DNS fragmenteket és az input mintákat 10 µg RNázal 30 percig 37°C-on emésztettük és 10 µg Proteináz K-val 2 órát 45°C-on 1000 rpm-en rázva inkubáltuk, ezzel eltávolítva róluk az RNS-eket és fehérjéket. Majd a DNS-t a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai alapján. A ChIP-DNS minták koncentrációját Qubit fluorométer (Invitrogen Qubit Quantitation Platform) segítségével határoztuk meg.

A ChIP-seq esetében 1-10 ng ChIP-DNS mintából kiindulva készítettünk indexelt cDNS könyvtárakat a TruSeq ChIP Library Preparation Kit (Illumina) segítségével a gyártó utasításai alapján. A szekvenálások Illumina NextSeq 500 rendszeren vagy HiSeq 2500 készülékeken történtek 75 ciklusos szekvenálással a DE-ÁOK-BMBI-Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumban és a Genfi Egyetem Genomics Core Facility-ben. (94–97)

A ChIP-qPCR mérésekhez a kilenc reprezentatív gén promóter régiójára terveztünk primereket, és a feldúsulást valós idejű kvantitatív PCR (polymerase chain reaction-polimeráz láncreakció) mérésekkel detektáltuk nyolc mintában (UT, PIC, CPG, IFNB, PIC+CPG, PIC+IFNB, CPG+IFNB, PIC+CPG+IFNB) triplikában az input mintákra normalizálva. A méréshez SYBR Green festéket (ready- to-use hot start reaction mix, LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche) használtunk. A SYBR Green képes interkalálódni a kettős szálú DNS-hez, így bármely kettős szálú DNS molekulát detektál a reakció során, ezzel aspecifikus detektálást tesz lehetővé. A QPCR mérés során a mérőműszer (LightCycler 480 Instrument, Roche) fluoreszcencia jelet detektál, melynek intenzitása arányos a keletkező PCR termék mennyiségével. Az 2. táblázat tartalmazza a primer szekvenciákat.

## 2. táblázat: ChIP-qPCR méréshez használt primerek

| Gén            | Forward primer               | Reverse primer               |
|----------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>Ebi3</i>    | 5'-ATCAGCCGGAAGGAAAGC-3'     | 5'-GGGAAAGGCCTTGAGGTAGA-3'   |
| <i>Tnf</i>     | 5'-TTCCTTGGTGGAGAAAACCA-3'   | 5'-ACCGAGACAGAGGTGTAGGG-3'   |
| <i>Il12b</i>   | 5'-CTGACAGGGTCCAACCTCAG-3'   | 5'-CCGCTTCTCCATTCTGTC-3'     |
| <i>Ifnb1</i>   | 5'-CCTTCATGGCCTGTGCTATT-3'   | 5'-TGAAAGGGAGAACTGAAAGTGG-3' |
| <i>Ccl5</i>    | 5'-AAAACTGAAATCACCTTGGAA-3'  | 5'-GGAGTCATCCTGGACTGGAG-3'   |
| <i>Cxcl10</i>  | 5'-CAGAGGCCAAGAGTGAAACC-3'   | 5'-CTCCCTTCCTGTTCTGGTGA-3'   |
| <i>Trim30d</i> | 5'-CCTGATGATTACGCCAACTG-3'   | 5'-CAGTTCCTGCCCTCAAAGTT-3'   |
| <i>Bst2</i>    | 5'-TGGGACTCGACTTAACAGTGG-3'  | 5'-TCTAGGAGACCAAACCGACAA-3'  |
| <i>Eif2ak2</i> | 5'-AATCTATTCCGCCCTCCGTTTC-3' | 5'-CCGGGAAAACGAAACAGAA-3'    |

A QPCR reakciókat 96 lyukú optikai plate-en futtattuk. A plate-re először ráértünk 50 ng ChIP-DNS-t mind a 8 mintából és a 8 input mintából 5-5 µl-enként triplikátumban így egy futtatás alkalmával 2 régió feldúsulását tudtuk megvizsgálni. A reakcióelegyet Eppendorf csőben állítottuk össze, majd 5-5 µl-ként hozzámértük templáthoz, a plate-et optikai fóliával lezártuk és 20 másodpercig centrifugáltuk 2000 rpm-en. Az egy mintára jutó reakcióelegy összetétele a következő volt: 5 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master, 0,26 µl 10 µM primer.

A futtatáshoz a következő hőmérsékleti protokollt alkalmaztuk: első lépés a denaturáció: 1 perc 94°C, a DNS szálakat összekötő H-hidak felbomlanak. A második lépés 40 cikluson keresztül ismétlődik: denaturáció (annealing): 12 másodperc 94°C, a primerek hozzákapcsolódnak a DNS szálakhoz, lánchosszabbítás (elongation): 30 másodperc 60°C, a DNS-polimeráz létrehozza a hiányzó szálakat a dNTP-vel. Az első ciklus véget ért. Az eredményül kapott DNS-szálak a következő ciklus templátjai lesznek, azaz minden ciklusban megkétszereződik a DNS mennyisége. ChIP minták szekvenálása a DE-ÁOK-BMBI-Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumban történt.

Megjegyzés: A disszertációban tárgyalt kísérleteknél a szerző a következő ChIP-DNS-eket készítette: STAT1, STAT2, IRF9, STAT1, STAT2. Az összes ismertetett bemutatott ChIP-qPCR kísérletet a szerző végezte el.

### 4.3. ChIP-seq analízis

A nyers ChIP-seq adatok elsődleges elemzését az Debreceni Egyetem, ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetben kifejlesztett ChIP-seq „pipeline” parancssorai segítségével végeztük (98). Az elemzések Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának HPC UNIX klaszterén történtek. A szekvenciaolvasások (read) az egér referencia genomra (mm10) lettek illesztve a Burrows-Wheeler Alignment Tool (BWA) szoftverrel (99). A feldúsult genomi régiók azonosításához a

Model-based Analysis of ChIP-Seq 2 (MACS2) szoftvert használtuk (100) a következő paraméterekkel: q-függvény küszöbértéke  $q = 0.001$  és a `-call-summits` kapcsoló használata, amely felbontja a nagyobb peak régiókat kisebb darabokra. A műtermékeket az ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) genomi régiók feketelistája segítségével zártuk ki (101). A konszenzus kötőhelyek azok a régiók, amelyek mindkét párhuzamos mintában detektálva lettek. Az IRF3, IRF5 és IRF9 cisztróмок meghatározásához az IRF3, IRF5 és IRF9 konszenzus kötőhelyeit összevontuk. A meghatározott kötőhelyek lefedettségét, az RPKM (Reads Per Kilobase per Million mapped reads) értéket a bamtools és a bedtools (coverageBed) szoftverekkel, és awk szkriptekkel határoztuk meg. A klaszterezéshez a lefedettségi értékek (occupancy values) a medián értékekre lettek normalizálva minden IRF esetében. Az adatok megjelenítéséhez és a reprezentatív ábrák készítéséhez az Integrative Genomics Viewer (IGV) genomböngészőt használtuk (102). A szekvencialeolvasások lefedettségét ábrázoló fájlokat az ún. bedgraph-okat átkonvertáltuk tdf fájlokra igvtools segítségével, a 'toTDF' paranccsal. A normalizált szekvencialeolvasások hőtérképen és hisztogramon (read distribution (RD) heat map/histogram) való megjelenítését HOMER (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment) program segítségével készítettük el (103), majd R vagy Java TreeView programmal vizualizáltuk. A ChIP-seq adatok nyers fastq fájljai az alábbi GEO azonosítók alatt találhatóak meg: GSE172376, GSE125340.

#### **4.4. A motívum keresés, súlyozott motívum mátrix (PWM) és DNS szekvenciák azonosítása**

Az elemzések Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának HPC UNIX klaszterén történtek. A *de novo* motívum keresését a HOMER 'findMotifsGenome.pl' programjával végeztük. A p-értéket úgy határoztuk meg, hogy a vizsgált kötőhelyeken feldúsult motívumokat összehasonlítottuk a HOMER által véletlenszerűen generált háttér szekvenciákon feldúsult motívumokkal.

A súlyozott motívum mátrixokat (Position weight matrices, PWMs) a HOMER adatbázisból importáltuk vagy magunk határoztuk meg (3. táblázat). Az ISRE, EICE, AICE1, NFkB, TRE, CRE és GAS motívumok PWM-i a HOMER adatbázisból származnak (3. táblázat). Az IECS, AICE2 és a TISRE motívumok PWM-jei nem voltak elérhetőek az adatbázisban, így azokat publikus ChIP-seq adatok *de novo* újraelemzésével határoztuk meg (3. táblázat). A PWM-ek visszatérképezését a genomra a HOMER 'scanMotifGenomeWide.pl' programmal végeztük.

3. táblázat: A tanulmányokban használt DNS motívumok

| Motívum | Motívum logó                                                                        | PWM forrása             | GEO azonosító |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|
| AICE1   |    | HOMER adatbázis19       | GSE66899      |
| AICE2   |    | de novo motívum keresés | GSE40918      |
| CRE     |    | HOMER adatbázis 142     | GSE31477      |
| EICE    |    | HOMER adatbázis 233     | GSE66899      |
| GAS     |    | HOMER adatbázis 273     | GSE12782      |
| IECS    |    | de novo motívum keresés | GSE56121      |
| ISRE    |    | HOMER adatbázis 136     | GSE43036      |
| NFKB    |  | HOMER adatbázis 208     | GSE19485      |
| TISRE   |  | de novo motívum keresés | GSE56121      |
| TRE     |  | HOMER adatbázis 141     | GSE31477      |

Konkrét DNS szekvenciák azonosításához a klaszterekben 6 bázis hosszú szekvenciákat (6-mer) és ISRE variánsokat generáltunk. Az egyes kötő régiók DNS szekvenciáját az egér genomából (GRCm38/mm10) azonosítottuk 'fastaFromBed bedtools' program alkalmazásával. Az összes kötő genomi régióban 'grep' paranccsal kerestük az összes általunk meghatározott 6-mer és ISRE variáns szekvenciát és azok reverz komplementerét is. A 5'-GAANNGAAA-3' szekvenciát R programban 'Biostrings' csomag segítségével azonosítottuk genom szinten.

#### 4.5. ATAC-seq kísérletek és elemzésük

Az ATAC-seq kísérleteket biológiai duplika alkalmazásával hajtottuk végre (29, 52). A sejteket hideg PBS oldatban felkapartuk, majd hígítottuk, hogy elérjük a 10 000-15 000/ml sejtszámot. Sejtlízist és sejtmaglízist végeztünk ATAC-lízis pufferrel (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 0,1 v/v% IGEPAL). A sejteket felfuszpendáltuk 50 µl lízis pufferben és 400 g fordulatszámon 4°C-on 10 percig centrifugáltuk majd a felülúszót eltávolítottuk. A lízált sejtmagon történt a tagmentálás Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) segítségével. A

tagmentálás után a DNS-t MinElute PCR Purification Kittel (QIAGEN) izoláltuk. A tagmentált DNS szakaszokat a Kapa Hifi Hot Start Kit (Kapa Biosystems) segítségével felsokszoroztuk 9 PCR ciklus során. A felsokszorozott könyvtárakat ismét a MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) segítségével izoláltuk. A könyvtárak fragmenteloszlását Agilent Bioanalyzer készülékkel határoztuk meg. A szekvenálások Illumina HiSeq 2500 készülékeken történtek 75 ciklusos szekvenálással a DE-ÁOK-BMBI-Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumban és a Genfi Egyetem Genomics Core Facility-ben.

Az ATAC-seq adatok elsődleges analizését a ChIP-seq elemzés során is használt pipeline parancsai segítségével végeztük, a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratóriumának HPC UNIX klaszterén. A saját adataink mellett GEO adatbázisból további ATAC-seq nyers adatokat (104) töltöttünk le és elemeztünk. A szekvencialeolvasások az egér referencia genomra (mm10) lettek illesztve a BWA szoftverrel (99). A feldúsult ATAC-seq régiók azonosításához a MACS2 szoftvert használtuk ( $q\text{-érték} \leq 0.001$ ) (100). A műtermékeket az ENCODE genomi régiók feketelistája segítségével zártuk ki (101)(101). Az eredmények megjelenítéséhez a bedgraph-okat 'UCSCfile.pl' paranccsal hoztuk létre, majd átkonvertáltuk tdf fájlokra az igvtools 'toTDF' parancsával. Az adatok megjelenítéséhez az IGV programba importáltuk ezeket. Az ATAC-pozitív régiók kiszámításához a 'bedtools intersect' parancsot használtuk. A variációs együtthatót (coefficient of variation, CV), a relatív variabilitás mértékét, az alábbi képlettel számoltuk:  $CV (\%) = (\text{szórás} / \text{átlag}) * 100$ . Az ATAC-seq adatok GEO azonosítója: GSE125340.

#### 4.6. Háromszög diagramok és Random Forest elemzés

A háromszög diagramok („ternary plot”) generálásához az R 'ggtern' nevű könyvtárcsomagot használtuk. A háromszög alakú diagram egy adott pontja három bemeneti változó (ChIP-seq szignál vagy mRNS szint) alapján lett számoltatva. A Random Forest gépi tanuló algoritmust Pythonban alkalmaztuk Random Forest Classifierrel a Scikit-learn könyvtárcsomagból. ChIP-seq, DNS motívum vagy ATAC-seq értékeknek a különböző halmazát használtuk bemeneti változóként és a klaszterek neveit használtuk osztálycímkekként.

#### 4.7 Génlisták

A különböző GO (The Gene Ontology) kategóriákba sorolható géneket az MGI adatbázisból (Mouse Genome Informatics database, <http://www.informatics.jax.org>) töltöttük le. Az antivirális citokinekhez tartoznak a vírusellenes immunválasz (GO:0051607) és a citokin aktivitás (GO:0005125) génjeit tartalmazó GO kategóriák közös elemei. A gyulladásos program génjeihez tartoznak az inflammatorikus válasz (GO:0006954) génjei, amelyeket a citokin aktivitás

(GO:0005125) vagy a DNS-kötő transzkripció faktor aktivitás (GO:0003700) kategóriákban is megtalálhatunk. Az antivirális ISG-k az irodalmi adatok alapján lettek kiválasztva (90, 91). Két listánál (effektor ISG-k és gyulladásal kapcsolatos citokinek) figyelembe vettük az RNA-seq eredményeket is. Az effektor ISG-k az antivirális ISG-k közül azokat tartalmazza, amelyeket IFN $\beta$  szignifikánsan indukált DC-ekben, és irodalmi adatok alapján effektor funkciót rendeltek (90, 91). A gyulladásal kapcsolatos citokinek (inflammation-related cytokines, IR-cytokines) azokat a géneket tartalmazzák, melyeket a CpG szingifikánsan indukált DC-ekben és megtalálhatóak voltak mind az inflammatórikus válasz (GO:0006954) mind a citokin aktivitás (GO:0005125) listákban.

#### 4.8. RNS izolálás és RT-qPCR

Az RNS-t Trizolate reagens (UD-GenoMed) alkalmazásával izoláltuk. A lízis után a szerves-vizes fázis optimális elválasztása kloroform hozzáadásával történt és az RNS-t a vizes fázisból alkoholos kicsapással nyertük vissza. Fagyasztás/felolvasztás után a mintákat szobahőmérsékleten 5-10 percig ráztuk majd kloroformos extrakciót végtünk. 1 ml Trizolate-os emulzióhoz 200 ml kloroformot (Sigma-Aldrich) adtunk majd néhányszor megforgattuk a csöveket, szobahőmérsékleten 5 percig ráztuk és 15 percig centrifugáltuk 4°C-on 16 000 g-vel, hogy a szerves és vizes fázisok elváljanak egymástól. A centrifugálás végén a fenol-kloroform elegy a csőben alul helyezkedik el (szerves fázis), felette található a kisebb fajsúlyú vizes-guanidinos fázis. A kicsapódott fehérjék az organikus és a vizes fázis határán (interfázis) sárgásfehér réteget alkotva helyezkednek el, míg a DNS az alsó, szerves fázisban és az interfázisban, az RNS pedig a felső, vizes fázisban található. A felső vizes fázist átmértük egy új 1,5 ml-es Eppendorf csőbe figyelve arra, hogy ne szívjunk bele a másik két fázisba, ezzel elkerülve a fehérje és DNS szennyezést. A vizes fázisból az RNS kicsapható azonos térfogatú izopropanollal (AnalaR Normapur), a vizes fázishoz 750 ml 100%-os izopropanolt adtunk, 10 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, közben 2-3 percenként megforgattuk a csöveket. A kicsapás után az RNS csapadékot 10 percig centrifugáltuk 4°C-on 16000 g-vel. A felülúszót eltávolítottuk, és közben figyeltünk arra, hogy a pellethez ne érjünk hozzá. A pelletet 1 ml 70%-os etanollal (abszolút etanolból hígítva, AnalaR Normapur) mostuk. Az etanol eltávolítása után az RNS-t szobahőmérsékleten beszárítottuk vákuumkoncentrátorban. Az RNS-t 40  $\mu$ l nukleáz mentes vízben (NFW, Affymetrix) vettük fel. A mintákat 10 percig inkubáltuk 65°C-on, vortexeltük, centrifugáltuk és 30 percre jégre tettük a beoldódás érdekében. Az RNS mintákat a mérések kezdetéig -20°C-on tároltuk.

A reverz transzkripció során a reverz transzkriptáz komplementer DNS szálat szintetizál (cDNS) PCR reakció során, melyhez a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Thermo Fischer Scientific) használtuk a gyártó utasításai alapján (4. táblázat).

4. táblázat: Egy mintára jutó RT reakcióelegy összetétele

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 10X RT Buffer                      | 2,0 µl |
| 25X dNTP Mix (100 mM)              | 0,8 µl |
| 10X RT Random Primers              | 2,0 µl |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1,0 µl |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O     | 4,2 µl |

A reverz transzkripcióhoz a következő hőmérsékleti protokollt alkalmaztuk: primertapátás (annealing): 10 perc 25°C, cDNS szintézis és RNáz H hidrolízis: 120 perc 37°C, enzim inaktiválás: 5 perc 72°C. Denaturációs lépésre nincs szükség mivel a QPCR hőmérsékleti protokollja egy 2 perces 94°C-os lépéssel indul. A futtatást Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler PCR készüléken végeztük. A keletkezett cDNS-t jégben, illetve -20°C-on tároltuk a QPCR mérések kezdetéig.

A qPCR mérések során a kilenc reprezentatív gén expresszióját határoztuk meg valós idejű kvantitatív PCR mérésekkel UT, PIC, CPG, IFNB mintákban biológiai és technikai triplikában. A méréshez SYBR Green festéket (ready- to-use hot start reaction mix, LightCycler 480 SYBR Green I Master, Roche) és LightCycler 480 készüléket (Roche) alkalmaztunk.

A QPCR reakciókat 384 lyukú optikai plate-en futtattuk. A plate-re először ráamértünk 50 ng cDNS-t 5-5 µl-enként triplikátumban. A reakcióelegyet Eppendorf csőben állítottuk össze, majd 5-5 µl-ként hozzámértük a templáthoz, a plate-et optikai fóliával lezártuk és 20 másodpercig centrifugáltuk 2000 rpm-en. Az egy mintára jutó reakcióelegy összetétele a következő volt: 5 µl LightCycler 480 SYBR Green I Master, 0,26 µl 10 µM primer.

A futtatáshoz a következő protokollt alkalmaztuk: (első lépés) 1 perc 94°C, (második lépés) 12 másodperc 94°C, (harmadik lépés) 30 másodperc 60°C. Ciklusok száma: 40 (második és harmadik lépés). Az adatok normalizálására az *Rplp0* háztartási gént használtuk. Az 5. táblázat tartalmazza azoknak a géneknek a nevét amelyeknek mértük a génexpressziós szintjét illetve a méréshez használt primerek szekvenciáját.

5. táblázat: Génexpressziós vizsgálatokhoz használt primerek

| Gén            | Forward primer                | Reverse primer                |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>Ebi3</i>    | 5'-GCTCCCCTGGTTACACTGAA-3'    | 5'-ACGGGATACCGAGAAGCAT-3'     |
| <i>Tnf</i>     | 5'-TATGGCCCAGACCCTCAC -3'     | 5'-GGTTGTCTTTGAGATCCATGC -3'  |
| <i>Il12b</i>   | 5'-AAGGAGGCGAGACTCTGAG-3'     | 5'-AACCGTCCGGAGTAATTG-3'      |
| <i>Ifnb1</i>   | 5'-CACAGCCCTCTCCATCAACTA-3'   | 5'-CATTTCCGAATGTTTCGTCCT-3'   |
| <i>Ccl5</i>    | 5'-CCTACTCCCACTCGGTCCT-3'     | 5'-CTGATTTCCTGGGTTTGCTGT-3'   |
| <i>Cxcl10</i>  | 5'-GCTGCCGTCATTTTCTGC-3'      | 5'-TCTCACTGGCCCGTCATC-3'      |
| <i>Trim30d</i> | 5'-TTTCAACTGCAGAGTTTGAAGAA-3' | 5'-CTCACACTTATGCATGGATGG-3'   |
| <i>Bst2</i>    | 5'-GAAGTCACGAAGCTGAACCA-3'    | 5'-CCTGCACTGTGCTAGAAGTCTC-3'  |
| <i>Eif2ak2</i> | 5'-CCAGCAGCTCGTCTATGACA-3'    | 5'-TTCCTTTTATTTTCTCCGAGACC-3' |
| <i>Rplp0</i>   | 5'-CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3'  | 5'-GGTGCCTCTGGAGATTTTCG-3'    |

Megjegyzés: A disszertációban bemutatott RNS izolálást, RT-PCR-t, génexpressziós vizsgálatokat kvantitatív PCR-al és az elemzését a szerző végezte el.

#### 4.9. RNS szekvenálás

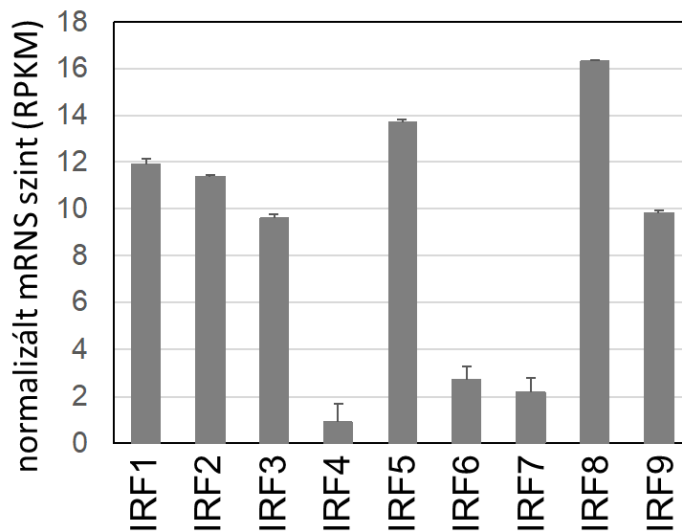
Az RNS-szekvenáláshoz (RNS-seq) az RNS-t Trizolate reagenssel (UD-GenoMed) izoláltuk. Az RNS minőségét qPCR technikával és Agilent BioAnalyzer készüléken ellenőriztük Eukaryotic Total RNA Nano Kit segítségével. A könyvtár készítést, szekvenálást és adatelemzést a DE-ÁOK-BMBI-Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium munkatársai végezték. Az RNA-Seq könyvtárakat a teljes RNS-ből Ultra II RNA Sample Prep kit (New England BioLabs) segítségével készítették. A szekvenálást Illumina NextSeq500 készüléken végezték 75 ciklusos szekvenálással. A nyers szekvenciákat az mm10 genomra illesztették HISAT2 segítségével. A későbbi elemzésekhez a BAM fájlokat a Strand NGS programba importálták (Strand Life Sciences Pvt. Ltd., Bangalore, India). A szabályozott gének azonosítására moderált t-tesztet alkalmaztak Benjamini-Hochberg korrekció ( $p < 0,05$  és  $(FC > 2,0)$  alkalmazásával.

Megjegyzés: Az RNS-seq kísérletek során a sejtenyészést, az RNS izolálást, a minták koncentrációmérését és a qPCR-al történő minőségi ellenőrzést végezte a szerző.

## 5. Eredmények

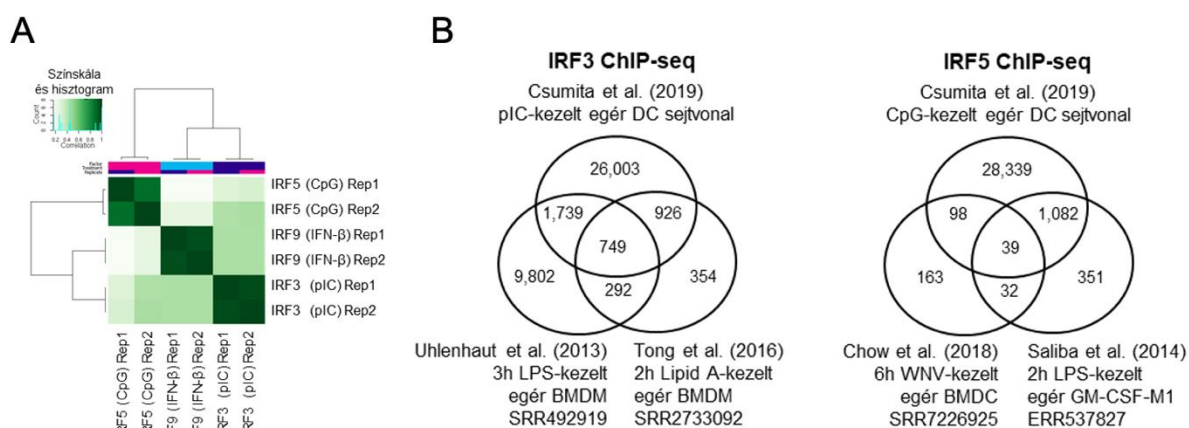
### 5.1. Az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék kötő régióinak feltérképezése

Az általunk használt CD8<sup>+</sup> DC sejtvonalban az IRF3, IRF5 és IRF9 magas szinten fejeződik ki mRNS szinten (8. ábra). Három másik IRF (IRF1, IRF2 és IRF8) szintén magasan expresszálódik, míg az IRF4, IRF6 és IRF7 mRNS szintje jóval alacsonyabb.



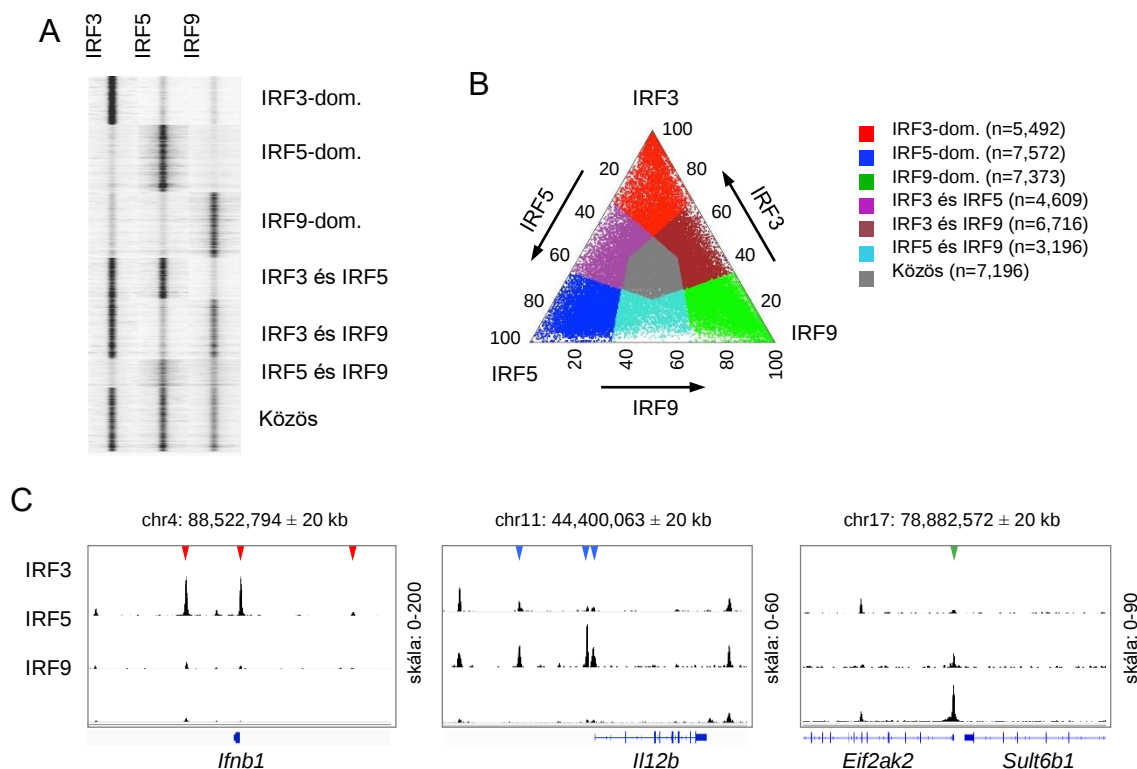
8. ábra: Az IRF fehérjék mRNS szintje a CD8<sup>+</sup> sejtvonalban, RNS-seq módszerrel meghatározva. A diagram három kísérlet átlagát és szórását ábrázolja, az összes read-számmal és génhosszal normalizálva.

Az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék kötő régióinak feltérképezéséhez ChIP-seq kísérleteket végeztünk. A CD8<sup>+</sup> DC sejteket 90 percig kezeltük CpG-vel, pIC-vel illetve IFN $\beta$ -al. Ezek az agonisták hatékonyan aktiválják azokat a receptorokat és jelátviteli útvonalakat, amelyek a vizsgálandó IRF-el vannak kapcsolatban. Ezek az útvonalak: pIC  $\rightarrow$  TLR3  $\rightarrow$  IRF3; CpG  $\rightarrow$  TLR9  $\rightarrow$  IRF5 és IFN $\beta$   $\rightarrow$  IFNAR1/2  $\rightarrow$  IRF9. A ChIP-seq kísérleteket biológiai duplikával végeztük, amelyek jól korreláltak egymással (9. A ábra).



9. ábra: A replikák és a különböző cisztromok összehasonlítása. (A) Korrelációs hő térkép, amely a ChIP-seq adatok Pearson korrelációs együtthatóját ábrázolja. (B) Az IRF3 és az IRF5 ChIP-seq adataink összehasonlítása más vizsgálatokkal.

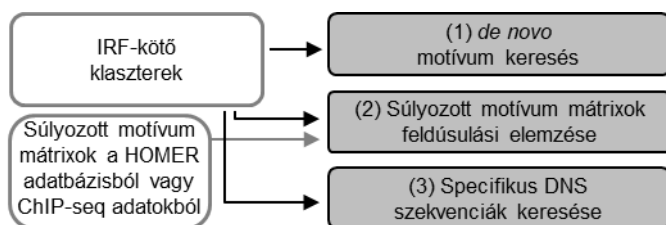
Azokkal a kötőhelyekkel dolgoztunk tovább, melyek egy adott minta mindkét replikájában azonosíthatóak voltak. Ezzel a módszerrel 25 203 (IRF3), 17 435 (IRF5) és 25 040 (IRF9) kötőrégiót azonosítottunk. Eredményeinkkel összehasonlító elemzést végeztünk nyilvánosan elérhető IRF3 és IRF5 ChIP-seq adatokkal (105–108)), melyet az 9B ábra mutat. (Megjegyzés: a tanulmányunk (95) beküldése óta több IRF9 ChIP-seq adat került publikálásra (81, 109), melyek akkor még nem voltak hozzáférhetőek.) Abban az esetben, ha az IRF3, IRF5 és IRF9 lefedettségi értéke egy adott genomi régióra hasonló értéket ( $0,5 < \text{lefedettségi hányados} < 2$ ) ért el, IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék közös kötő genomi régióról beszélünk és közös klaszternek nevezzük. További három klasztert definiáltunk, amelyekben az egyik IRF fehérje kötődése az adott genomi régióhoz gyengébb volt, mint a másik két IRF-fehérje kötődése. Az IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns régiókat az 10C ábra *Ifnb1*, *Il12b* és *Eif2ak2* reprezentatív gének szabályozó elemeivel illusztráltuk. Ezeket a géneket IRF3, IRF5 és IRF9 célgénjeiként azonosítottuk (110–112).



10. ábra: IRF3, IRF5 és IRF9 kötőhelyek csoportosítása a kötési specificitás alapján. (A) Az IRF ChIP-seq szignálokat megjelenítő RD (read distribution) ábra, 2 kb régióban, az IRF csúcsok körül centrálva. A ChIP-seq kísérletekhez az egér DC-ket 90 percig kezeltük pIC, CpG vagy IFN $\beta$  liganddal, majd meghatároztuk az IRF3, az IRF5 és az IRF9 kötőhelyeit. A hét IRF-kötő klasztert az indukciós értékei alapján osztályoztuk. A domináns klaszterek normalizált lefedettségi értékei legalább kétszeres különbséget mutatnak a másik két IRF klaszterhez viszonyítva. (B) Az IRF3, IRF5 és IRF9 által elfoglalt kötési régiók eloszlását egy háromszög diagram mutatja. Az egyes pontok helyét a háromszög belsejében a normalizált IRF3, IRF5 és IRF9 lefedettségi értékek alapján számítottuk ki. (C) IGV genomböngészőben megjelenített IRF3, IRF5 és IRF9 kötő régiói három reprezentatív gén TSS körüli 40 kb-os ablakban. A nyilak jelzik az IRF3-domináns (piros), IRF5-domináns (kék) vagy IRF9-domináns (zöld) kötő régiókat.

## 5.2. DNS-motívumok előfordulása az IRF klaszterekben

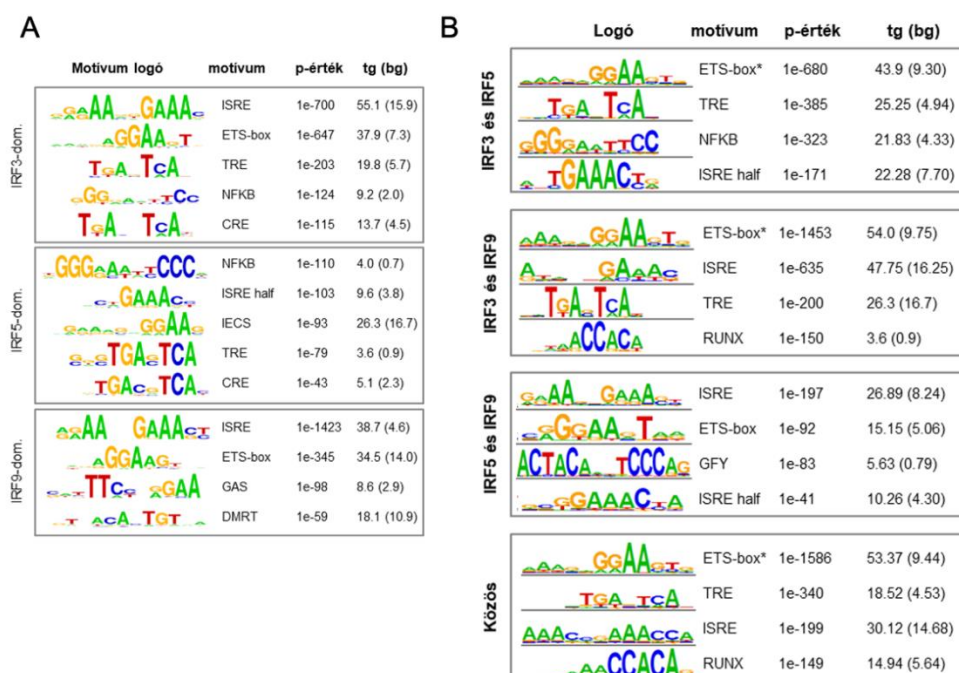
Három stratégia alkalmazásával elemeztük a DNS-motívumokat a klaszterekben: (1) „de novo” motívum kereséssel, (2) súlyozott motívum mátrixok (PWM) feldúsulásainak elemzésével és (3) specifikus DNS-szekvenciák keresésével (11. ábra). Mindhárom stratégiának megvannak a maga előnyei és korlátai, ezért ezeknek a megközelítéseknek a kombinálása átfogóbb képet eredményez.



11. ábra: A klaszterekben azonosított DNS-motívumok és szekvenciák három különböző stratégiáját ábrázoló séma.

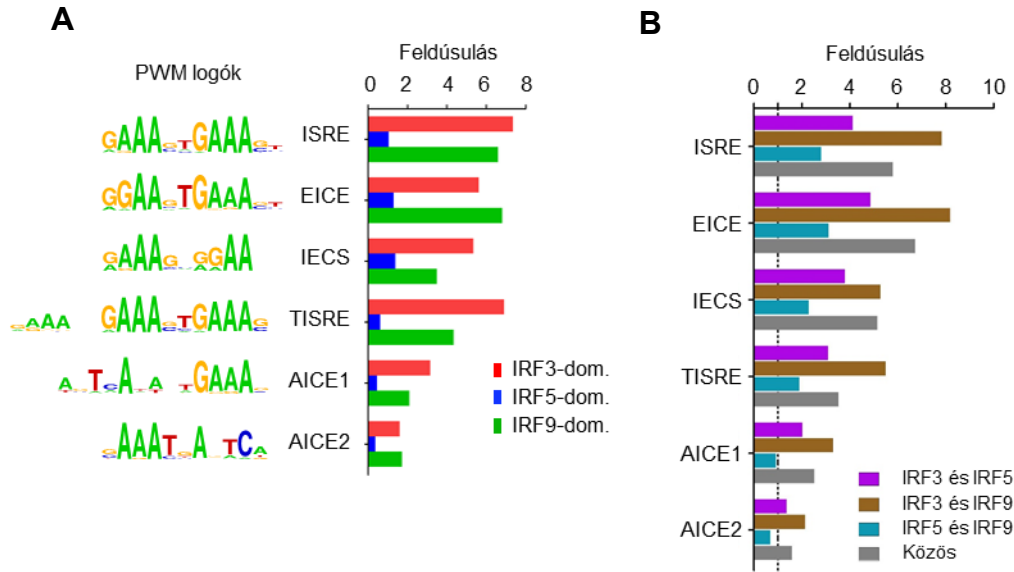
Az első megközelítést (*de novo* motívum keresés, 12A-B ábra) felhasználva azt találtuk, hogy az IRF3- és IRF9-domináns klaszterekben feldúsult motívumok olyan DNS-motívumok voltak, amelyek hasonlóak az ISRE-hez, vagy ISRE kompozit elemekhez, például az ETS-IRF kompozit elemhez (EICE) (113, 114) (12B ábra). Összhangban a korábbi IRF5 ChIP-seq vizsgálatokkal (106, 107, 115), *de novo* motívum kereséssel nem sikerült azonosítani ISRE motívumot az IRF5-domináns klaszterben, azonban az ISRE félhely és gyenge IRF-Ets kompozit elem (IECS) feldúsulást mutatott (116). Ezek mellett az IRF-kötő motívumok mellett számos más motívumot is azonosítottunk, köztük az NF-kB-kötő motívumot (kB vagy NFkB), a TPA válasz elemet (TRE), a cAMP válasz elemet (CRE) és az IFN-gamma aktivációs szekvenciát (GAS). Ezek a motívumok, olyan transzkripciós faktorok kötő régiói, amelyek útvonal specifikusan aktiválódnak az IRF-fehérjékkel. TLR aktiválás során az IRF3 vagy IRF5 együtt aktiválódik az AP-1 család tagjaival, melyek a TRE vagy CRE motívumokhoz kötődnek (117), és az NFkB család tagjaival, melyek az NFkB motívumhoz kötődnek (118). Az I. típusú IFN-ok indukálják az ISGF3 komplex kialakulását STAT1 homodimerekkel, melyek a GAS motívumhoz kötődnek (119–121).

A második megközelítésünkben motívum mátrixok (position weight matrix, PWM) feldúsulását vizsgáltuk a klaszterekben (13. és 14. ábra). A „*de novo*” motívum keresésekben a hasonló motívumok összevonódnak, továbbá adott motívumok közvetlen összehasonlítása a klaszterek között nem lehetséges. Ebben segít a PWM-ek feldúsulásának vizsgálata. A HOMER adatbázisból és újraelemzett ChIP-seq adatokból gyűjtöttünk IRF faktorok kötőhelyeiként azonosított elemek PWM-jeit. Az ISRE, EICE, IECS és az együttesen aktivált transzkripciós faktor motívumok mellett három hosszabb motívumot is vizsgáltunk. Az AP-1 és IRF kompozit elemeket (AICE1 és AICE2), melyeket az IRF4/IRF8 és a ko-regulátor transzkripciós faktoraik kötőhelyeként (122–126), és a TISRE motívumot, melyet korábban az IRF1, IRF2 és IRF8 fehérjék kötőhelyeként azonosítottak (127–129). Az egyes motívumok küszöbértékét (cut-off value) szisztematikusan határoztuk meg véletlenszerűen kiválasztott régiók halmaza alapján, és a PWM-ek feldúsulását ezekhez viszonyítva határoztuk meg.



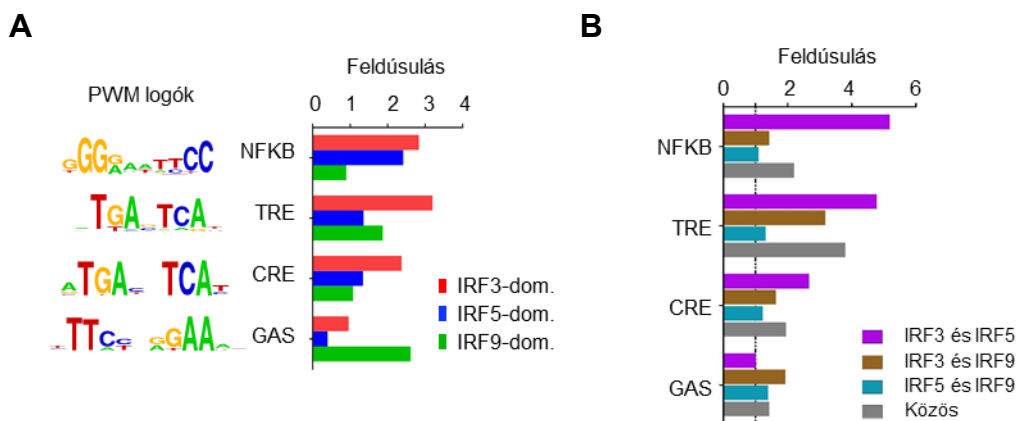
12. ábra: A *de novo* motívumok keresésének eredményei az IRF-klaszterekben. (A) IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns klaszterek, és (B) egyéb IRF klaszterek analízésének eredményei. Láthatjuk az adott motívum logóját, azt, hogy melyik adatbázisban található motívumhoz hasonlít, a motívum frekvenciáját (%) az adott klaszterben („target”, tg) és a HOMER által véletlenszerűen generált háttér szekvenciákon („background”, bg).

Eredményeink alapján három alapvető megfigyelést tettük. Első megfigyelésünk az volt, hogy az IRF3 és IRF9 domináns klaszterekben dúsult fel a legjobban az ISRE motívum (13A ábra). Ezzel összhangban az IRF3-IRF9 közös klaszterben is magas volt az ISRE frekvenciája (13B ábra). Második megfigyelésünk, hogy a TISRE motívum különösen gyakori volt az IRF3-domináns, az IRF9-domináns és IRF3-IRF9 közös klaszterekben (13A-B ábra). Harmadik megfigyelésünk, hogy az EICE motívum az ISRE motívumokhoz hasonló dúsulást mutatott a vizsgált klaszterekben. Ezek az eredmények nem jelentik azt, hogy az IRF3-dimerek és az ISGF3 komplex magas frekvenciával kötik az EICE motívumot. Sokkal valószínűbb, hogy az IRF3-dimerek és az ISGF3 komplex előnyben részesíti azokat a hozzáférhető genomi régiókat, amelyek a PU.1 és az IRF8 által kötöttek és azáltal nyitottak. Mindkét transzkripciósfaktor LDTF, azaz felelősek az adott dendritikus sejt alpopuláció sejtípus specifikus kialakulásáért (130), és együttesen kötik az EICE és IECS motívumot (116).



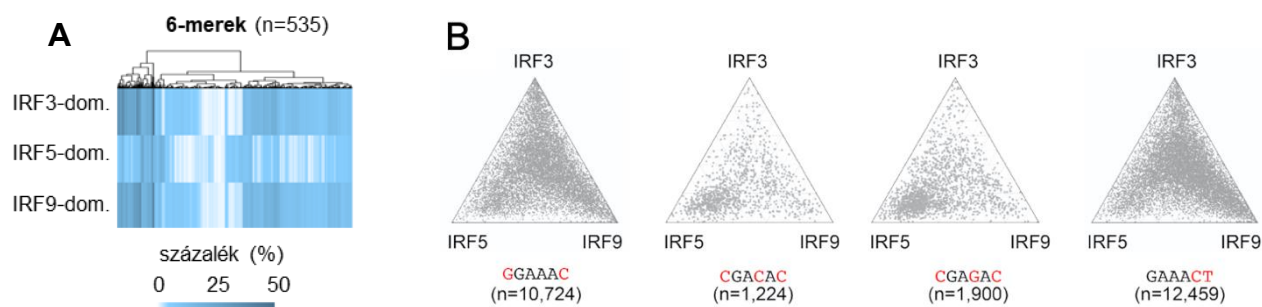
13. ábra: IRF felismerő szekvenciák motívumainak feldúsulása az (A) IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns klaszterekben, és (B) egyéb IRF klaszterekben.

A második megközelítésünk (PWM feldúsulások) további elemzéseiben azt vizsgáltuk, hogy milyen előfordulása van az NFkB, TRE, CRE és GAS motívumoknak (14. ábra). Ezek a motívumok olyan transzkripció faktorok kötőhelyei, melyek együtt aktiválód(hat)nak bizonyos IRF-ekkel. A *de novo* motívum keresés eredményei és PWM feldúsulásának elemzése általában összhangban voltak. Az egyetlen eltérést az IRF5 domináns klaszter esetében figyeltük meg, ahol a TRE és CRE motívumok a *de novo* elemzés során feldúsulást mutattak, azonban a súlyozott motívum mátrix analízis során nem. Az NFkB motívum az IRF3-domináns, az IRF5-domináns, valamint a közös IRF3-IRF5 klaszterben, míg a GAS motívum az IRF9 domináns klaszterben dúsult fel jelentősen (14A-B ábra). A TRE motívum az IRF3-domináns, a közös IRF3-IRF5 és IRF3-IRF9 klaszterekben, míg a CRE az IRF3-domináns, és közös IRF3-IRF5 klaszterekben fordult elő nagyobb gyakorisággal, mint a többi klaszterben (14A-B ábra).



14. ábra: TLR által aktivált transzkripciós faktorok és STAT dimerek felismerő szekvenciák motívumainak feldúsulása az (A) IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns klaszterekben, és (B) egyéb IRF klaszterekben.

A harmadik megközelítésünk során specifikus DNS-szekvenciák előfordulását vizsgáltuk IRF klaszterekben. Először az ISRE-félhelyeket elemeztük (15. ábra). A 4 bázis hosszú ISRE-félhely (5'-GAAA-3') és változatai helyett azért választottunk 6 bázis hosszú szekvenciákat, mert az IRF-fehérjék kötődését az ISRE félhelyek 5' és 3' túlnyúló végükön található bázisok is befolyásolják (131). Készítettünk egy 6-mer listát (n=535, 15A ábra), amely tartalmazta a kanonikus 5'-GAAA-3' ISRE félhely szekvenciát és két extra bázist három lehetséges pozícióban (5'-NNGAAA-3', 5'-NGAAAN-3' vagy 5'-GAAANN-3'), egy bázis eltérést engedélyezve. Meghatároztuk ezeknek a 6-mer szekvenciáknak a gyakoriságát a klaszterekben. Sok olyan szekvenciát azonosítottunk (n=84), amelyek legalább 1,5-szer gyakrabban fordultak elő az IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns klaszterekben, mint a másik két domináns klaszterben. Legtöbb (n=68) ezek közül a legnagyobb feldúsulást az IRF5-domináns klaszterben mutatta. Több 6-mer szekvencia feldúsulása is egybeesett a korábbi „in vitro” vizsgálatok eredményeivel. A fehérje-kötő microarray (Protein binding microarray, PBM) vizsgálatok azt mutatták, hogy a 5'-GGAAAC-3'szekvencia nagyobb affinitással kötődik az IRF3 fehérjéhez, mint az IRF5, IRF6 vagy IRF9 fehérjékhez (131, 132). Ezzel a megfigyeléssel összhangban azt találtuk, hogy a GGAAAC szekvencia feldúsulást mutatott az IRF3-domináns klaszterben (15B ábra, első diagram). PBM kísérletek bizonyították, hogy az IRF5 fehérje sokkal jobban tolerálja az ISRE-félhely 3. és 4. pozícióban lévő bázisok eltérését a kanonikus szekvenciáktól, mint az IRF7 (132) vagy más vizsgált IRF fehérjék (131). Több olyan 6-mer szekvenciát detektáltunk az IRF5 domináns klaszterben melyek bázisai ezekben a pozíciókban eltért a kanonikus szekvenciától (például CGACAC és CGAGAC, a második és harmadik diagram 15B ábrán).

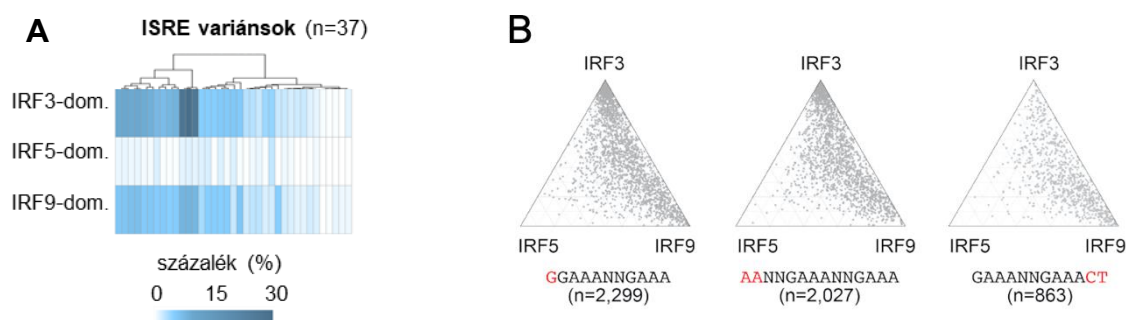


15. ábra: A kibővített 6 bp hosszú ISRE félhelyek előfordulása az IRF klaszterekben. (A) Az IRF-domináns klaszterekben a 6-merek frekvenciáját a hő térkép mutatja. (B) Példák az IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns klaszterekben feldúsulást mutató 6 bp hosszú ISRE félhelyek. A megjelölt variánsokat tartalmazó kötő régiók eloszlását háromszög diagramok mutatják. Az egyes pontok helyét a háromszög belsejében a normalizált IRF3, IRF5 és IRF9 lefedettség értékek alapján számítottuk ki.

További PBM kísérletek alapján a TGAAAC szekvenciát nagyobb affinitással kötötte az IRF9 fehérje, mint az IRF3, IRF5 vagy IRF6 fehérjék (131). Elemzésünk során azt találtuk, hogy ez a szekvencia és még további néhány 6-mer szekvencia (például: GAAACT, 15B ábra, negyedik plot) mutatott feldúsulást az IRF9 domináns klaszterben.

A harmadik megközelítésünk további elemzéseiben olyan speciális ISRE variánsok (n=37) jelenlétét vizsgáltuk a klaszterekben, amelyeket korábbi tanulmányok alapján (128, 131–133) vagy a saját ISRE félhely 6-mer szekvenciák alapján választottunk ki (16A ábra). 20 olyan ISRE variánst azonosítottunk, amelyek legalább 1,5-szer gyakrabban fordultak elő az IRF3-domináns klaszterekben, mint a másik két klaszterben. Az IRF9-domináns klaszterekben 4 ilyen ISRE variánst azonosítottunk, viszont nem találtunk olyan ISRE-variánsokat, amelyek gyakrabban fordultak volna elő az IRF5-domináns klaszterben, mint a másik két klaszterben.

Összhangban a 6-bp ISRE félhely eredményeinkkel, azt találtuk, hogy a GGAAANNGAAA szekvencia gyakrabban fordul elő az IRF3-domináns klaszterben a többi klaszterhez képest (16B ábra, első diagram). Azok az ISRE variánsok, melyekben két extra AA bázist tartalmazott az 5' végén szintén nagyobb feldúsulást mutattak az IRF3-domináns klaszterben (16B ábra, második diagram). Az EMSA és a fehérje krisztallográfiás kísérletek során azt találták, hogy az ISGF3 komplex által kötött szekvenciák hosszabbak, mint a 10 bp hosszú konszenzus ISRE motívum, az IRF9 és a STAT fehérjék kötési preferenciája miatt (80, 134). Elemzéseink során azt találtuk, hogy az 5'-GAAANNGAAACT-3' (16B ábra, harmadik diagram) feldúsulást mutatott az IRF9 domináns klaszterben.

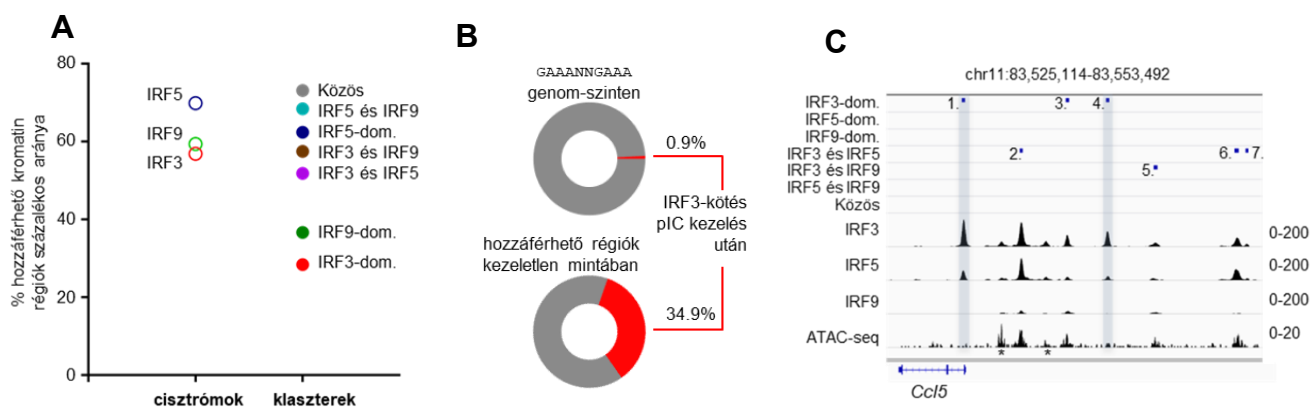


16. ábra: A speciális ISRE szekvenciák előfordulása az IRF kötési klaszterekben. (A) Az IRF-domináns klaszterekben az ISRE szekvenciák előfordulását hő térkép mutatja. (B) Példák az IRF3- és IRF9-domináns klaszterekben feldúsulást mutató speciális ISRE szekvenciákra. A megjelölt variánsokat tartalmazó kötő régiók eloszlását háromszög diagramok mutatják. Az egyes pontok helyét a háromszög belsejében a normalizált IRF3, IRF5 és IRF9 lefedettség értékek alapján számítottuk ki.

### 5.3. A kromatin hozzáférhetősége az IRF klaszterekben

Ahogy a Bevezetésben áttekintettük, a SRTF-ek kötődésének nagy része a korábban (LDTF-ek által) „kijelölt”, nyitott, hozzáférhető enhanszer régiókban történik (135, 136). A kromatin nyitottság és SRTF kötés kölcsönösen hat egymásra: a nyitottság jelentős mértékben meghatározza a bekötődést, viszont a kötődés tovább „nyitja” a régiót. Az LPS által stimulált makrofágokban azt találták, hogy az IRF3 fehérje elősegítheti a nukleoszómák átrendeződését és/vagy a korábban zárt/kevésbé hozzáférhető kromatin nyitását (137). Az ISGF3 komplex által történő kromatin nyitást szintén tanulmányozták (109, 138, 139). Tudomásunk szerint az IRF5 kromatin átrendező képességét nem vizsgálták átfogó tanulmányokban. A kromatin hozzáférhetősége fontos meghatározó lehet az IRF-specifikus enhanszerek kiválasztásában. Ezért megvizsgáltuk a hozzáférhető kromatin régiókat ATAC-seq (29) kísérletekkel stimulálatlan (UT) DC-kben.

Kiszámoltuk az IRF-ek összes kötőhelye és a klaszterekben a hozzáférhető kromatin régiók százalékos arányát (17A ábra). Az IRF-ek összes kötőhelye esetében azt találtuk, hogy a különbség kisebb volt (~13%) a legalacsonyabb és a legmagasabb frekvencia között (IRF3: 56,8% és IRF5: 69,8%). Az IRF klaszterek esetében sokkal nagyobb különbséget (~50%) detektáltunk a legalacsonyabb és a legmagasabb frekvencia között (IRF3-domináns: 23,8% vs. Közös: 73,8%). A specifikus klaszterek közül az IRF5-domináns klaszterekben találtuk a legtöbb hozzáférhető kromatin régiót (62,4%). Az IRF3-kötő régiók, a hozzáférhető kromatin régiók és a kanonikus ISRE (5'-GAAANNGAAA-3') szekvencia átfedését szintén meghatároztuk (17B ábra).



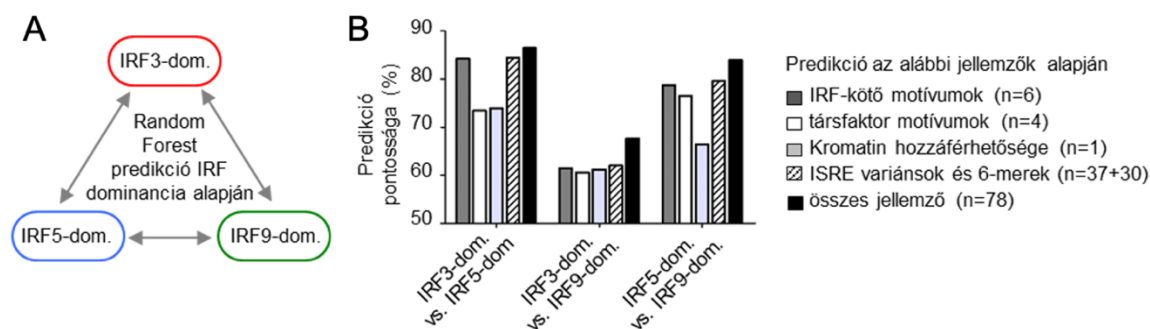
17. ábra: A kromatin nyitottsága az IRF kötőhelyeken ATAC-seq adatok alapján. (A) A nyitott (ATAC-seq pozitív) régiók előfordulása kezeletlen dendritikus sejtekben az IRF-ek összes kötőhelye („cistromes”) és IRF klaszterek esetében. (B) Az IRF3 kötőhelyek (6 órás pIC-kezelést követően, ChIP-seq) átfedése a kanonikus ISRE szekvenciák helyeivel és a nyitott (ATAC-seq pozitív) genomi helyekkel. (C) Az IRF3, IRF5 és IRF9 kötőhelyei, valamint az ATAC-seq szignálok az IGV genomböngészőben a *Ccl5* genomi régióban. Két olyan hely (1. és 4. számú) kiemelve, amelyeken a stimuláció előtt nem volt detektálható az ATAC szignál.

A kanonikus ISRE szekvenciáknak csak kis részét (<1%) foglalta el az IRF3 *in vivo* aktiválás után. Ezzel szemben a stimuláció előtt hozzáférhető régiók ~35% -át foglalta el az IRF3 fehérje. Egy adott gén többféle IRF kötőhellyel lehet kapcsolatban. A már megjelölt (nyitott) és a kötő régiók sokféleségére reprezentatív példa a *Ccl5* gén szabályozó elemei (17C ábra). Összességében megállapítottuk, hogy az ATAC-negatív régiók feldúsultak az IRF3- és IRF9-domináns régiókban, ami arra utal, hogy a „zárt” nehezen hozzáférhető kromatin hozzájárul az IRF3- és IRF9-domináns (de nem a IRF5-domináns) kötőhelyek specificitásához, más IRF-ek kötődésének kizárásával. Megfigyeléseink összhangban állnak más transzkripciós faktorokkal kapcsolatos eredményekkel, amelyek arra utalnak, hogy a kromatin állapota kulcsszerepet játszik a szelektív transzkripciós válaszok kialakításában (140).

#### 5.4. Az IRF dominancia prediktálása gépi tanulási módszerrel

A gépi tanulási módszerek egyik alkalmazása „osztálycímkek” predikciója bemeneti adatok alapján. A Random Forest segítségével megvizsgáltuk, hogy az IRF dominanciát milyen pontosan lehet prediktálni a kötőhelyek jellemzőinek felhasználásával. Páronkénti összehasonlítást végeztünk úgy, hogy a kötőhelyek klaszter-címkeje (IRF3-, IRF5- vagy IRF9-domináns) szolgált „osztálycímkeként” (18A ábra). Bemeneti adatként tíz motívum PWM pontszámait, az ATAC-seq szignálértékeket, ISRE variánsok és 6-mer szekvenciák előfordulási értékeit alkalmaztuk, vagy ezek kombinációját használtuk. A predikció pontosságát a helyes és az

összes predikció aránya alapján adtuk meg, a predikció helyes volt, amikor az eredeti és a prediktált osztálycímek megegyeztek. Jelenetős különbség volt, annak függvényében, hogy melyik jellemzőket használtuk a predikcióhoz (18B ábra).



18. ábra: Az IRF dominancia prediktálása. (A) A Random Forest módszer páronkénti összehasonlítása. (B) A predikció pontossága Random Forest módszerrel, különböző bemeneti adatok (IRF-kötő motívumok, egyéb SRTF motívumok erőssége, az ATAC-seq szignálok, az ISRE-variánsok és a 6-merek előfordulási gyakoriságai, vagy az összes jellemző együtt) felhasználásával.

Összességében az eredmények azt mutatták, hogy minden jellemző figyelembevételével az osztálycímek nagy pontossággal (~80-85%) prediktálhatóak voltak, amikor az IRF5-domináns klasztert összehasonlítottuk a másik két domináns klaszterrel. Az osztálycímke prediktálása kevésbé volt pontos (~65%) az IRF3-domináns és az IRF9-domináns klaszterek összehasonlításakor. Ez azt jelenti, hogy az IRF5-domináns klaszter jelentősen különbözik a másik két klasztertől, míg a kötőhely jellemzők alapján az IRF3 és IRF9 domináns klaszterek kevésbé váltak el egymástól.

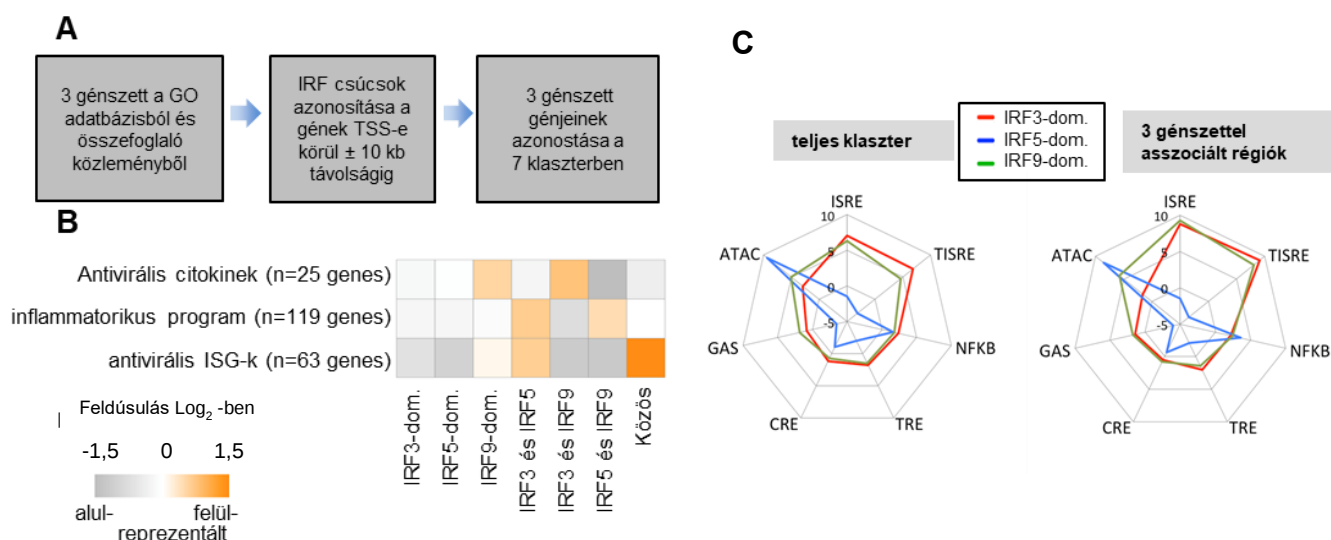
## 5.5. Az IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns régiók és az IRF-ek által szabályozott transzkripciós programok kapcsolatának vizsgálata

Az IRF klaszterek feldúsulását megvizsgáltuk három transzkripciós program génjeinek kibővített promóter régióiban (19. ábra). Az antivirális citokinek, a gyulladásos program génjei (citokinek és transzkripciós faktorok), és az antivirális ISG-k közül sokat az IRF3, az IRF5 és az IRF9 fehérjék célgénjeként azonosítottak (141–145). Három génlistát állítottunk össze a GO (The Gene Ontology) listák és a szakirodalom (90, 91) alapján.

Az antivirális citokinek (n=25), a gyulladásos program génjei (n=119) és az antivirális ISG-k (n=63) transzkripciós starthely körül 20 kb méretű régióit (TSS  $\pm$  10 kb) meghatároztuk, majd azonosítottuk ott az IRF kötőhelyeket (19A ábra). Ezután megvizsgáltuk az adott kötőhely típusát,

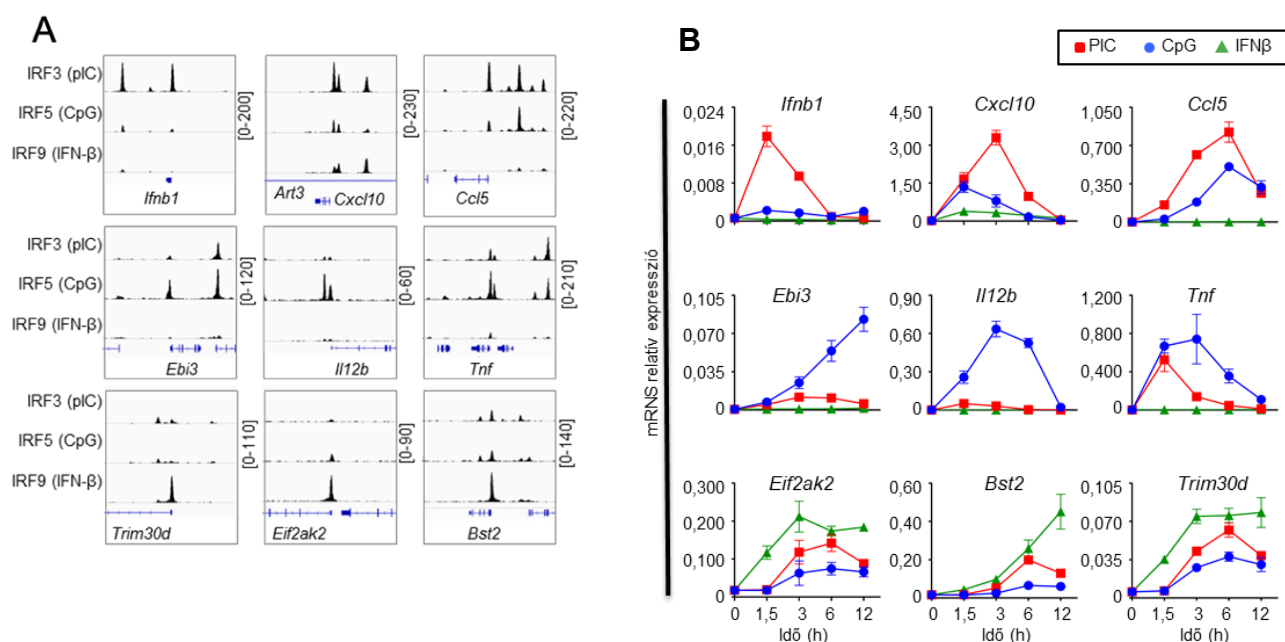
és kiszámítottuk a relatív (klasztermérettel normalizált) feldúsulást (19B ábra). Az elemzés során azt találtuk, hogy az antivirális citokinek TSS  $\pm 10$  kb régióiban az IRF3 domináns klaszter (és kisebb mértékben IRF3-IRF5 közös klaszter) mutatott feldúsulást. A gyulladásos programban részt vevő gének TSS  $\pm 10$  kb régióiban az IRF5-domináns és az IRF3-IRF5 közös klaszterek dúsultak fel, míg az antivirális ISG-k TSS  $\pm 10$  kb régióiban, az IRF9 domináns és az IRF3-IRF9 közös klaszterek fordultak elő leggyakrabban (19B ábra). Megvizsgáltuk az azonosított, fenti három génlistához kapcsolható 28 IRF3-, 62 IRF5- és 45 IRF9-domináns kötőhelyek jellemző DNS motívumait és kromatin nyitottságát (19C ábra). Az elemzés azt mutatta, hogy a teljes klaszter és azon részhalmazai a legtöbb esetben hasonló mintázatot mutattak. Különösen feltűnő volt az IRF5-domináns kötőhelyek magas NFkB motívum pontértéke és ATAC-seq szignálja, illetve alacsony ISRE motívum pontértéke (19C ábra).

Az IRF3, IRF5 és IRF9 kötődésének és génexpresszió kapcsolatának vizsgálatához reprezentatív géneket választottunk ki (20. ábra). Olyan antivirális citokineket, gyulladásos citokineket és antivirális ISG-eket azonosítottunk, amelyek az IRF3, IRF5 vagy IRF9 domináns csúcsokkal asszociáltak a promóter régióikban (20A ábra). RT-qPCR technika alkalmazásával megvizsgáltuk az mRNS szintjüket különböző ligandok jelenlétében, az idő függvényében (1,5-12 óra).



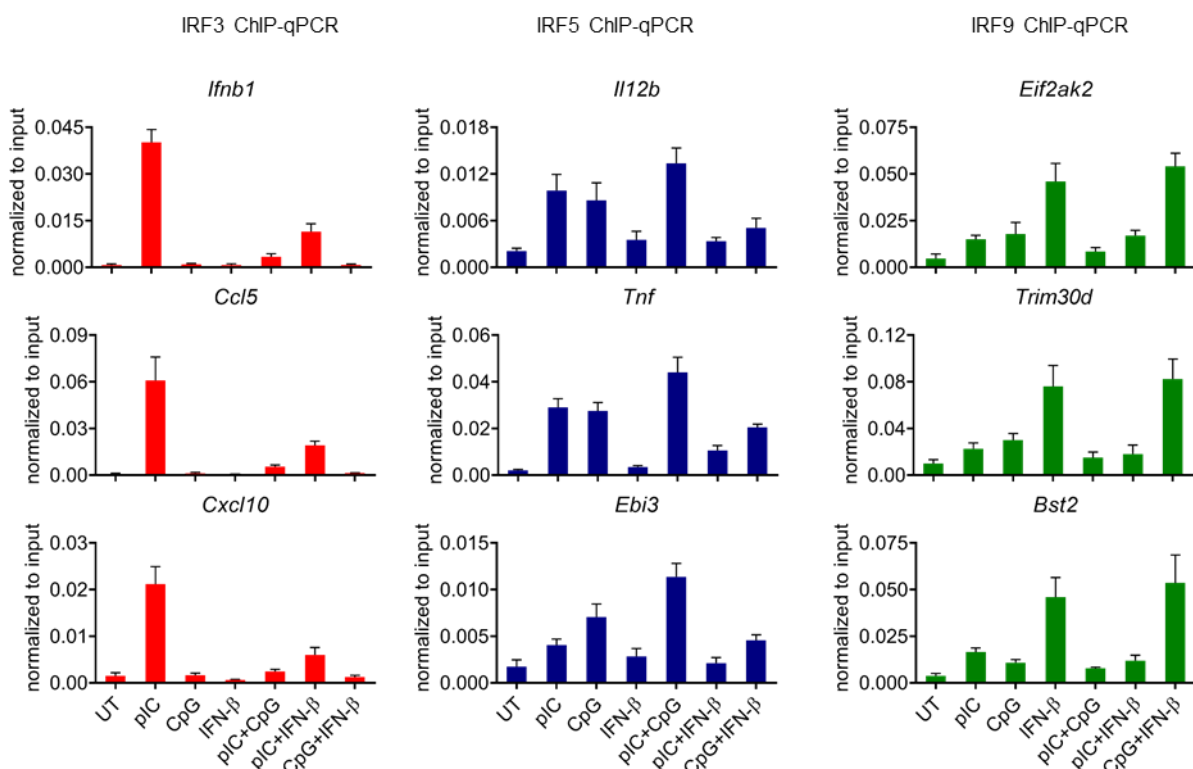
19. ábra: Az IRF klaszterek kötőhelyeinek és a transzkripciós program kapcsolata (A) A feldúsulás-elemzés lépéseit mutató séma. (B) Az IRF-kötő klaszterek feldúsulása a három transzkripciós programhoz tartozó gének transzkripciós starthelye (TSS) körüli 20 kb méretű régiókban. (C) A gráfok az IRF3- (piros), IRF5- (kék) és IRF9-domináns (zöld) kötő régiók a DNS motívumok és ATAC-seq szignálértékek mediánját mutatják. Az értékeket a teljes klaszterekből (balra) vagy a három transzkripciós programhoz tartozó gének TSS körüli 20 kb-os régiók (jobbra) kötőhelyeiből számoltatva.

Megállapítottuk, hogy a kiválasztott antivirális citokineket, az inflammatórikus citokineket és az antivirális ISG-eket a leghatékonyabban rendre a pIC, a CpG és az IFN- $\beta$  szabályozzák (20B ábra). Fontos kiemelni, hogy mivel a géneket számos enhanszer szabályozhatja, és a TLR jelátviteli útvonalak egyszerre több SRTF-t aktiválhatnak, az adott ligand hatását nem feltétlenül kizárólag csak ezek a régiók és vizsgált IRF fehérjék mediálják. Eredményeink azt mutatták, hogy a régiók, amelyek túlnyomórészt IRF3, IRF5 vagy IRF9 fehérjék által szabályozottak, fontos kötőhelyek az adott transzkripciós válaszokhoz. ChIP-qPCR módszer segítségével megvizsgáltuk, hogy a TLR és IFN útvonalak között kimutatható-e együttműködés vagy gátlás kombinált ligandkezelések esetén (21. ábra). Ezekben a kísérletekben a DC-eket egy agonistával, vagy a ligandok kombinációival stimuláltuk. Megállapítottuk, hogy az IRF3 kötődését az antivirális citokinek IRF3 domináns régióihoz az összes kombinált kezelés gátolja. Az IRF5 kötődése a gyulladásos gének IRF5-domináns régióihoz nagyobb feldúsulást mutatott, amikor a pIC + CpG kombinált kezelést alkalmaztuk. Mivel az IRF5 fehérjét a TLR3 és a TLR9 agonista is aktiválta, a megnövekedett IRF5-kötődésének a két útvonal közötti együttműködés lehet az oka. Végül, az IRF9 kötődése az antivirális ISG-k IRF9-domináns régióihoz hasonló volt, amikor az IFN $\beta$ -t önmagában vagy CpG-vel kombinált kezelést alkalmaztuk, ami arra utal, hogy a TLR9 útvonal nem képes gátolni az IRF9 aktivációját vagy kötődését.



20. ábra: Az IRF3, IRF5 és IRF9 kötődésének és a génexpresszió kapcsolata reprezentatív gének esetében. (A) Az IRF3, IRF5 és IRF9 kötődésének IGV genomböngészőben való megjelenítése három reprezentatív antivirális citokin (fent), gyulladásos citokin (középen) és antivirális ISG (alul) régiójában. (B) Ugyanazon gének indukcióját qPCR-el határoztuk meg dendritikus sejtekben, amelyet pIC, CpG és IFN $\beta$ -ligandokkal stimuláltunk. Az expressziót az Rplp0-hoz viszonyítva normalizáltuk. A diagramokon három párhuzamos kísérlet átlagát és SD-jét láthatjuk.

Ezzel szemben a TLR3 útvonal gátolta az IRF9 aktivációját vagy kötődését az IRF9-domináns régiókba. Ezek az eredmények együttesen azt sugallják, hogy az IRF-ek és más SRTF-ek közötti verseny vagy együttműködés jelentősen befolyásolja az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék kötődését. Figyelembe véve, hogy vannak TF-ok, amelyeket különböző mértékben mind a TLR3, mind a TLR9 képes aktiválni (pl. IRF3, IRF5 és AP-1), megállapítható, hogy ezeknek az útvonalaknak vannak közös célpontjai. Ezért összességében megállapítható, hogy az együttes ligandkezelés esetében az interakciók megvalósulhatnak útvonalak között, IRF-ek között illetve IRF-ek és más SRTF-ek között.

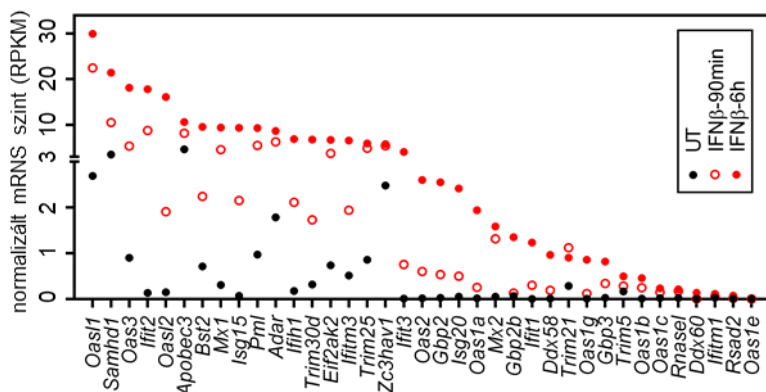


21. ábra: Az IRF-kötés az antivirális citokinek, gyulladásos gének és antivirális ISG-k promóter régióiban. Az ChIP-PCR adatok a párhuzamos replikák átlagát és SD-jét mutatják. Az IRF3 (piros), az IRF5 (kék) és az IRF9 (zöld) kötődését nem stimulált (UT), és pIC, CpG, IFN- $\beta$  vagy ezeknek a ligandumoknak a kombinációjával stimulált (90 percig) DC-kben mértük.

## 5.6. Az effektor ISG-k lehetséges szabályozóelemeinek azonosítása

A fentebb ismertetett eredményeink publikálása után (95) újabb, IRF-ek kötésével kapcsolatos vizsgálatokat végeztünk. Az IRF-specifikus kötőhelyek elemzése után olyan kísérleteket végeztünk, amelyben az effektor ISG-k szabályozó elemeit azonosítottuk és karakterizáltuk CD8<sup>+</sup> DC-ben (146). Először RNA-seq felhasználásával elkészítettük azoknak az ISG-knek a listáját (n=1936), amelyek 6 órás IFN $\beta$ -kezelés után legalább kétszeres indukciót

mutattak. Az ISG-k listájából kiválasztottuk azokat a géneket, amelyeket korábbi vizsgálatokban „antivirális effektorként” írtak le (90, 91). Ily módon 37 effektor ISG-t azonosítottunk (22. ábra).

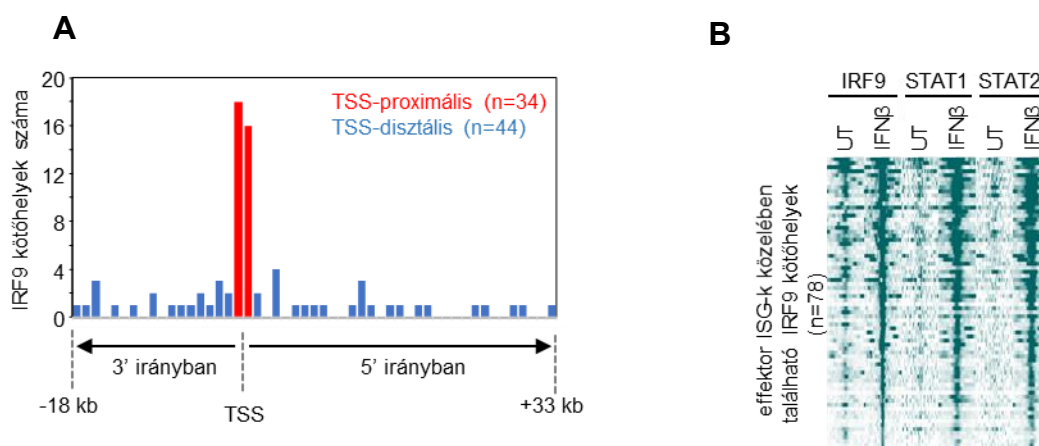


22. ábra: Az IFN $\beta$ -aktivált ISG-k expressziós szintje kezeletlen és IFN $\beta$ -kezelt dendritikus sejtekben. Vizsgálatainkhoz RNA-seq módszert használtunk, az effektor ISG-k ( $n=37$ ) mRNS szintjeit kezeletlen, 90 percig és 6 óráig kezelt DC-kben határoztuk meg. A grafikon 3 replika normalizált átlagértékeit mutatja.

Az effektor ISG-k szabályozó elemeit az IRF9 kötőhelyeinek feltérképezésével azonosítottuk. Egy adott sejtben aktív (vagy aktiválható) génszabályozó elemek többféle módszerrel azonosíthatóak, de minden módszernek megvannak a korlátai (147–149). Az egyik lehetséges módszer az aktivált SRTF-ek feltérképezése. Ennek az lehet a hátránya (ha nem kombináljuk más módszerrel), hogy nincs információ arról, hogy a bekötődés az enhanszer aktivitásával jár-e. Bizonyos útvonalak esetében probléma lehet továbbá, hogy egy receptor több SRTF-et aktivál (pl. TLR-ok esetében az NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF faktorok), amelyek kötőhelyei csak részben fednek át. Esetünkben ez utóbbi nem volt jelentős probléma, mivel az IRF9 alapvető komponense az IFN-indukált transzkripció programoknak.

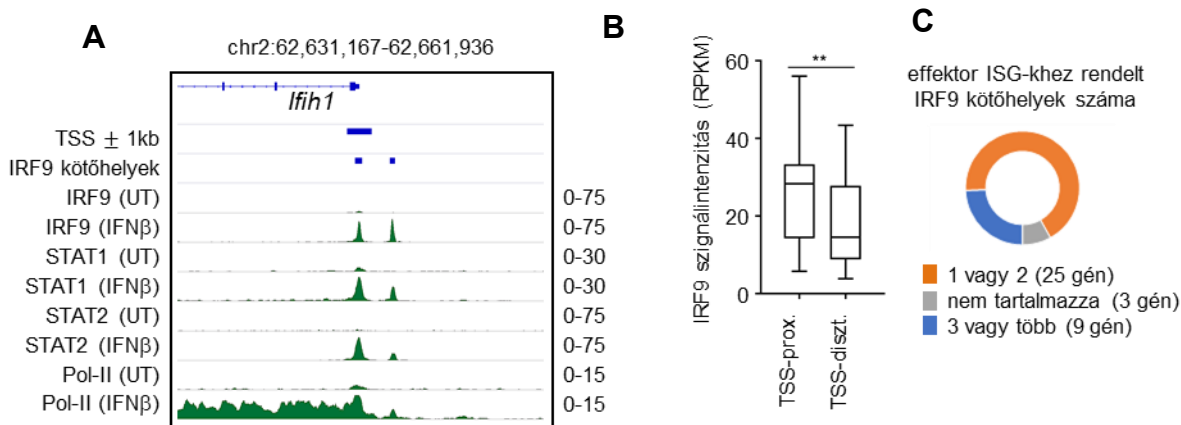
A szabályozó elemek és a szabályozott gének összekapcsolása továbbra is jelentős technikai kihívás (150). Mivel az enhanszer-promoter kölcsönhatások többsége  $\sim 50$  kb távolságon belül történik (151), és többnyire a kötőrégiók a legközelebbi gén expresszióját szabályozzák, lehetséges a szabályozott gének közelség alapján történő előrejelzése. Fontos megjegyezni, hogy az enhanszer-promoter párok összerendelése ebben az esetben csak becslés vagy feltételezés, és bizonyos esetekben téves hozzárendelésekhez vezethet (147). Mindazonáltal, ez a megközelítés kísérleteket nem igényel, egyszerű bioinformatikai módszerrel elvégezhető és az esetek jelentős részében az enhanszer-promoter párok összerendelése helyes, ezért általánosan alkalmazzák és ebben a tanulmányban mi is ezt használtuk.

Az elemzésünkhöz az IRF9 ChIP-seq adatainkat használtuk. További ChIP-seq kísérleteket is végeztünk STAT1, STAT2 és RNS-polimeráz II (Pol-II) ellenes antitestek felhasználásával. Összesen 27546 IRF9 kötőrégiót azonosítottunk IFN $\beta$ -vel stimulált DC-kben (konszenzus set: replikák közös régiói). 9289 régiót azonosítottunk, amelyekben az összes ISGF3 alegység (IRF9, STAT1 és STAT2) kötődését kimutattuk az IFN $\beta$ -vel stimulált DC-kben. Összesen 78 IRF9 kötőrégiót azonosítottunk, amelyekhez egy effektor ISG-t rendelt a HOMER algoritmus legközelebbi génként. A 78 kötőrégióból 34 található a transzkripció kezdőhelyétől 1 kb-on belül (TSS-proximális IRF9 kötőrégiók). A többi IRF9 kötőrégió ettől nagyobb távolságra volt, maximálisan 33 kb-ra (23A ábra). Meghatároztuk az ISGF3 alegységek kötését, és azt találtuk, hogy az IRF9 szignálintenzitásokkal korreláltak a STAT1 és STAT2 szignálintenzitások ezekben a régiókban (23B ábra).



23. ábra: Az effektor ISG-k szabályozó elemeinek feltérképezése IRF9 kötőhelyek azonosításával. (A) IRF9 kötőhelyek közül azokat szelektáltuk ki, amelyekhez effektor ISG-eket azonosított a HOMER program legközelebbi génként. Ezeket a kötőhelyeket a transzkripció starthelyétől (TSS-től) való távolság alapján TSS-proximális (kevesebb, mint 1 kb), és TSS-disztális IRF9 kötőhelyekre osztottuk. (B) Az effektor ISG-khez IRF9 kötőhelyeken (egy 4 kb méretű ablakban) mutatja az ábra az IRF9, STAT1 és STAT2 ChIP-seq szignálértékeket.

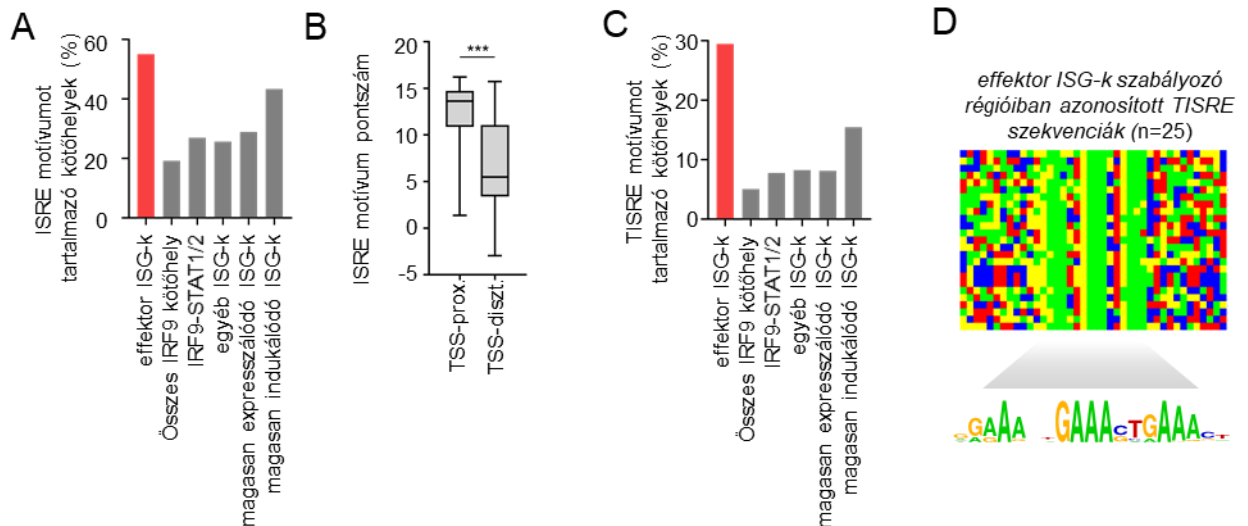
Egy reprezentatív effektor ISG 30 kb régiója az IRF9, STAT1, STAT2 csúcsok a Pol-II-vel együtt a 24A ábrán láthatók. Fontos megfigyelésünk volt, hogy az IRF9 szignálintenzitások magasabbak voltak a TSS-proximális régiókban, mint a TSS-disztális régiókban (24B. ábra). Az effektor ISG-k többsége (n = 30) olyan IRF9 kötőhellyel volt kapcsolatban, amely kevesebb, mint 1 kb-ra volt a TSS-től. Az effektor ISG-eket a kapcsolódó IRF9 csúcsok száma alapján osztályoztuk. Mint korábban említettük, 3 gén volt, amelyekhez nem társult IRF9 csúcs. A legtöbb effektor ISG (n = 25) egy vagy két IRF9 csúccsal, míg 9 effektor ISG három vagy több IRF9 csúcshoz kapcsolódott (24C ábra).



24. ábra: Az effektor ISG-k szabályozó elemei. (A) A genomböngésző egy reprezentatív effektor ISG két szabályozó elemén mutatja az IRF9, STAT1, STAT2 és Pol-II szignálokat egy 30 kb régióban. (B) Az effektor ISG-khez rendelt TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 szignálértékei (t-teszt,  $**p < 0,001$ ). (C) Az effektor ISG-khez rendelt IRF9 kötőhelyek száma.

### 5.7. Az ISRE és TISRE az effektor ISG-k szabályozó régióiban

Megvizsgáltuk az ISG-khez tartozó IRF9 kötő régiókban az ISRE (5'-GAAANNGAAA-3') szekvencia jelenlétét. Az ISRE szekvenciát az effektor ISG-khez tartozó 78 IRF9 kötőhely közül 43-ban azonosítottuk. Ez az előfordulási gyakoriság (55,1%) magasabb volt, mint a más ISG-khez tartozó régiókban számolt frekvenciák (25A ábra). A HOMER program segítségével minden IRF9 kötőhelyben azonosíthattuk azokat a szekvenciákat, amelyek leginkább hasonlítottak az ISRE motívumra, és meghatároztuk a motívum pontszámát, amely tükrözi az azonosított szekvencia súlyozott motívum mátrixhoz való hasonlóságát. A motívum pontszámok vizsgálata az effektor ISG-hez rendelhető TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötőhelyeken azt mutatta, hogy a pontszámok alacsonyabbak a TSS-től disztálisan elhelyezkedő kötőhelyeken (25B ábra). Kiszámoltuk az TISRE előfordulási gyakoriságát is, és azt tapasztaltuk, hogy több mint háromszor gyakoribb volt az effektor ISG-khez tartozó IRF9-kötő régiókban más ISG-khez képest (29,5%, 78 kötőhelyből 23-ban) (25C ábra). A következő 22 effektor ISG tartalmazta a TISRE motívumot az IRF9 kötő régióiban: *Bst2*, *Ddx60*, *Eif2ak2*, *Gbp2*, *Gbp3*, *Ifit1*, *Ifit2*, *Ifit3*, *Isg15*, *Isg20*, *Mx1*, *Mx2*, *Oas1a*, *Oas1c*, *Oas1g*, *Oas3*, *Oasl2*, *Rnasel*, *Samhd1*, *Trim21*, *Trim5*, és *Zc3hav1*. A legtöbb TISRE csak 1-2 bázissal különbözött a kanonikus 5'-GAAANNGAAANNGAAA-3' szekvenciától (25D ábra).



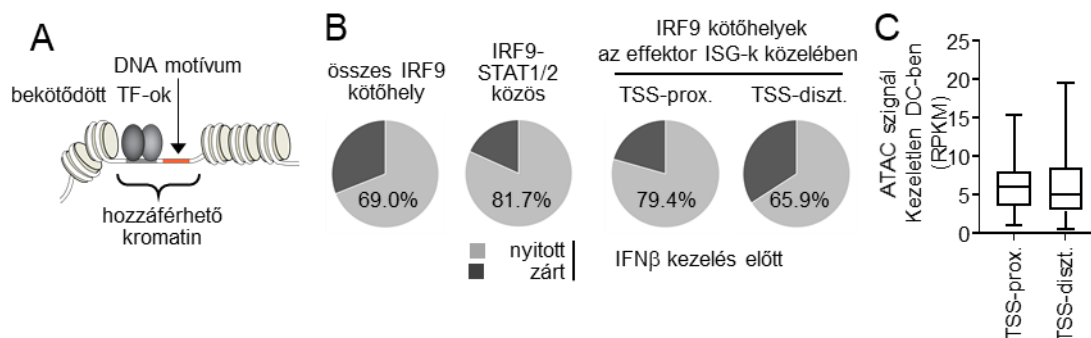
25. ábra: Az effektor ISG-k szabályozó elemeiben azonosítható ISRE és TISRE elemek. (A) Az effektor ISG-k és más kontrollként használt génlistákhoz tartozó kötéshelyek szabályozó elemeiben azonosítható ISRE elemek százalékos előfordulása. (B) Az effektor ISG-khez rendelt TSS-proximális és TSS-disztális ISRE-k motívum-értékei (t-teszt, \*\*\* $p < 0,001$ ). (C) Az effektor ISG-k és más kontrollként használt génlistákhoz tartozó kötéshelyek szabályozó elemeiben azonosítható TISRE elemek százalékos előfordulása. (D) Az effektor ISG-k szabályozó régióban azonosított TISRE szekvenciák.

## 5.8. A kromatin nyitottság vizsgálata az effektor ISG-k szabályozó elemeiben

Ahogy korábban áttekintettük, az SRTF-ek kötődését nemcsak a DNS-motívumok határozzák meg, hanem más fehérjékkel való kölcsönhatások, epigenetikai szignálok és a kromatin nyitottsága is (26A ábra). Az ISGF3 képessége a kromatin nyitottság átalakítására jól dokumentált jelenség (84, 109, 152), ezért ezt tanulmányunkban nem vizsgáltuk. Három kérdésre kerestük a választ az effektor ISG-k szabályozó régiók nyitottságával kapcsolatban: (1) Milyen mértékben nyitottak az effektor ISG-k TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötéshelyei a stimuláció előtt a DC-kben? (2) Mennyire nyitottak az effektor ISG-k TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötéshelyei más sejtekben? (3) Mennyire nyitottak a DC-kben és a különböző sejtípusokban az egyes gén-szettek promoter régiói? Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolásához saját ATAC-seq adatainkat és nyilvánosan elérhető ImmGen adatokat (104) használtunk.

Első kérdésünk megválaszolásához meghatároztuk az elérhető régiók gyakoriságát különböző kötéshely listákban (26B ábra). Megállapítottuk, hogy az összes IRF9 kötéshelyek nagy része nyitott (ATAC-seq pozitív) volt a stimuláció előtt (69,0%), ami arra utalt, hogy más SRTF-ekhez hasonlóan az ISGF3 is jelentős mértékben kötődik a már létező nyitott (aktív vagy

aktiválható) régiókhoz. Az effektor ISG-khez kapcsolódó TSS-proximális IRF9 csúcsok gyakrabban voltak elérhetők (79,4%), mint a TSS-disztális IRF9 kötőhelyek esetében (65,9%). Az ATAC-seq szignálintenzitásokban nem észleltünk különbséget a TSS-proximális és a TSS-disztális IRF9 csúcsok között (26C ábra).

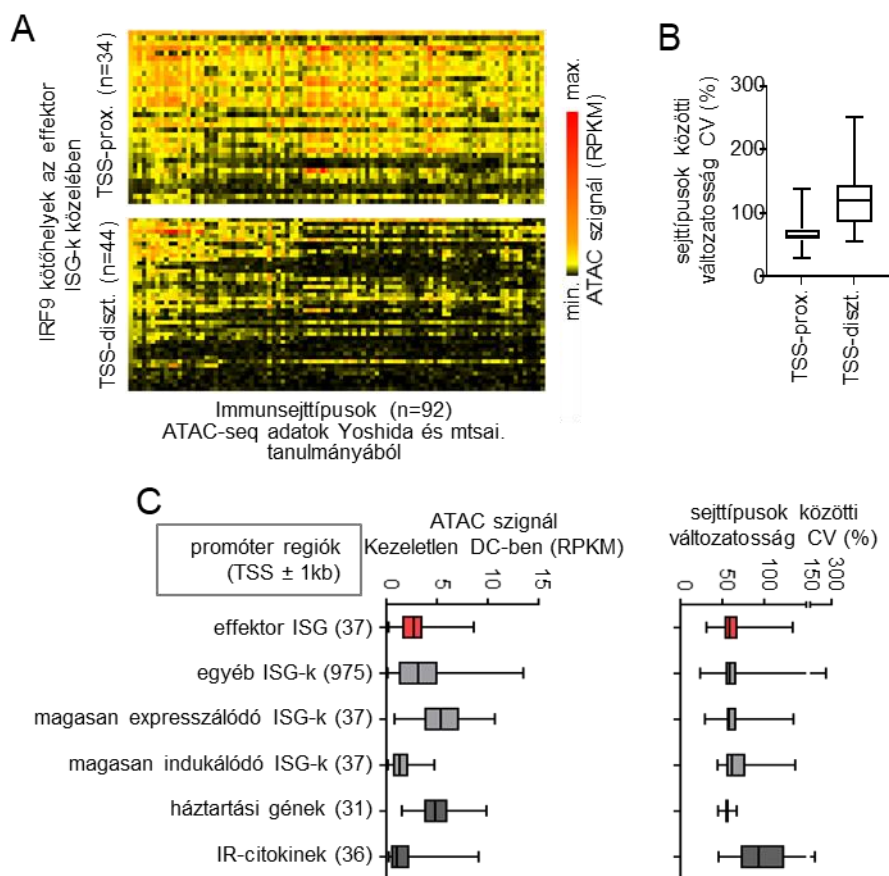


26. ábra: A kromatin nyitottsága az effektor ISG-khez rendelhető IRF9 kötőhelyeken a DC-ben. (A) Az ábra egy tipikus aktiválható szabályozó elemet mutat, aminek a nyitottságát (így aktiválhatóságát) meghatározzák a már bekötődött TF-ok, általában LDTF-ek. (B) A kromatin nyitottsága az az összes IRF9 kötőhelyen, illetve a TSS-proximális és TSS-disztális effektor ISG-khez rendelhető IRF9 kötőhelyeken. A nyitottság meghatározása kezeletlen DC-kben történt ATAC-seq módszerrel. (C) Az effektor ISG-khez rendelt TSS-proximális és TSS-disztális nyitottsága ATAC-seq szignál-értékekkel kifejezve.

Második kérdésünk megválaszolásához megvizsgáltuk az effektor ISG-khez rendelt IRF9 kötőhelyek nyitottságát letölthető ImmGen ATAC-seq adatokat felhasználva (104). Kiszámítottuk az ATAC szignál-értékeket 34 TSS-proximális és 44 TSS-disztális IRF9-kötő régióban 92 immunsejttípusban (27A ábra). A variációs együttható (CV) értékeit használtuk a sejtek közötti variancia számszerűsítésére. Azt találtuk, hogy egy adott effektor ISG TSS-proximális IRF9 kötőhelyeinél az ATAC szignál-értékek jellemzően kevésbé változtak (alacsonyabb CV-t eredményezve), mint a TSS-disztális IRF9 szignál-értékek (27B ábra). Ezek az adatok azt sugallják, hogy sok TSS-disztális szabályozóelem sejtspecifikus módon működik, az ISGF3 kötődése ezekhez a helyekhez sejtspecifikus kötődési mintákat és célgénaktivációt mutatnak (20, 54).

Harmadik kérdésünk megválaszolásához elemeztük a DC-k és különböző sejttípusok promoter régióinak nyitottságát. Ezekben az analízisekben két további génlistát, a háztartási gének (housekeeping genes, HK) (n=31) és a gyulladásal kapcsolatos citokinek (IR, inflammation-related, n=36) listáját is elemeztük összehasonlításként. A DC-kben az ATAC szignál-értékek mediánját és a 92 sejttípusban az ATAC-seq szignál-értékek CV-jét kiszámítottuk (27C ábra). Azt

találtuk, hogy DC-kben az ATAC szignál-értékek medián értékei hasonlóak az „összes egyéb ISG-k” értékéhez, és magasabbak, mint a legjobban indukálódó ISG-k és az IR-citokinek értékei (27C ábra, bal oldali diagram). A különböző immunsejteket összevetve az ATAC-jelek CV-jében az effektor ISG-k és más ISG-listák között (27C ábra, jobb oldali diagram). A HK gének homogénebbek voltak (alacsonyabb CV értékek, kisebb szórással), mint bármely más génlistánál számolt adatok. Az ATAC-jelek CV-je magasabb volt az IR-citokinekben, mint a többi készletben (27C ábra, jobb oldali diagram).



27. ábra: A kromatin nyitottsága az effektor ISG-khez rendelhető szabályozó elemeken különböző immunsejteken. (A) A hőtérkép az effektor ISG-khez rendelt IRF9 kötőhelyek nyitottságát mutatja ImmGen ATAC-seq adatokat (104) felhasználva 92-féle immunsejtben. (B) A variációs együttható (CV) értékei a sejtek közötti variációt mutatják a TSS-proximális és disztális effektor ISG-khez rendelhető IRF9 kötőhelyeken. (C) Gének promóter régióinak nyitottsága. A bal oldali diagram különböző génlisták génjeinek promóterjeinek nyitottságát mutatja DC-kben. A jobb oldali diagram az ATAC szignál-értékek mediánját mutatja 92 immunsejtben. HK, háztartási gének (housekeeping genes); IR-citokines, gyulladásal kapcsolatos citokinek, (inflammation-related cytokines).

## 6. Megbeszélés

Az első tanulmányunkban (95) vizsgált IRF-ek, az IRF3, IRF5 és IRF9, eltérő, de részben átfedő szerepet játszanak az antivirális citokinek szabályozásában, a gyulladásos reakciókban és az antivirális állapot kialakításában. Eredményeink azt mutatták, hogy az IRF fehérjék által felismert DNS-motívumok és a további jellemzők, például a társfaktorok kötődése és a kromatin hozzáférhetősége szerepet játszanak a specifikus-kötés kialakításában. Fontos megjegyezni, hogy az IRF-domináns klaszterek régiói eltérőek voltak, és nem minden régióra volt igaz az adott klaszter jellemzőinek a mintázata. A régiók változatossága és az a tény, hogy egy adott jellemző nem csak kizárólag egy klaszterben fordul elő, azt jelzi, hogy különböző jellemzők sorozata kombinatorikus módon befolyásolja az IRF-specifikus kötődést, és nem kizárólag az erősen polarizált DNS-szekvenciák. A vizsgálati rendszerünkben azonosítottuk és összehasonlítottuk az IRF3-, IRF5- és IRF9-domináns régiókat. A három domináns klaszter közül az IRF5-domináns klaszter alapvetően különbözött az IRF3- és IRF9-domináns klaszterektől. Az IRF5 fehérje három potenciális mechanizmuson keresztül foglalhat el genomi régiókat: homo- vagy heterodimerként, monomerként és közvetett módon kötődhet az ISRE-hez. Eredményeink azt mutatták, hogy az ISRE motívum feldúsult az IRF3 és IRF5 megosztott és a közös klaszterben, ami arra utalhat, hogy az IRF5 fehérjék egy része heterodimerként kötődik a kanonikus ISRE motívumhoz. Azon megfigyelések alapján, hogy a *de novo* motívum kereséssel ISRE félhelyeket azonosítottunk az IRF5 cisztrómban, és egy másik tanulmányban PBM vizsgálatok alapján azonosított IRF5 logó hasonlít az ISRE félhely motívumra (GAAA) (153), nem feltétlenül jelenti azt, hogy az IRF5 fehérje dominánsan vagy kizárólag monomerekként kötődik a DNS-hez. Andrienas és munkatársai szerint (153) a rövidebb logó egy dimer helyet képvisel, aminek az a következménye, hogy egy IRF5 fehérje az ISRE félhelyhez erőteljesebben kapcsolódik. Tehát, a PBM kísérletek alapján az IRF5 dimerként kötődik, és az aszimmetrikus ISRE-félhelyeket preferálja (153). A harmadik mechanizmus szerint az IRF5 nem köti közvetlenül a DNS-t, hanem más transzkripciósfaktorok határozzák meg a kötőhelyét. Ezt a mechanizmust bizonyították az IRF3 fehérje esetében, amely szignál-specifikus kofaktorként funkcionál az NF- $\kappa$ B-függő gének transzkripciójának aktiválása során anélkül, hogy az ISRE motívumhoz kötődne (141, 154). Az IRF5 fehérje által közvetített génszabályozás igazolása, amely a fehérje közvetett kötődése révén valósul meg további kísérleti megerősítést igényel.

Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy az IRF5-domináns klaszternek három jellemző tulajdonsága van. Az első megállapításunk, hogy az IRF5 domináns régiók többsége nem tartalmaz ISRE motívumokat. Egy nemrégiben elvégzett tanulmányban bizonyították, hogy az ISRE-félhely 5' és 3' végén C-től eltérő bázisok (5-CGAAAC-3) megakadályozhatják az IRF5 fehérje kötődését

az IFN promóterének vírus-válaszeleméhez (153). Elemzésünk során megfigyeltük, hogy nemcsak azok az ISRE variánsok, amelyek ezeken a helyeken a C-től eltérő bázisokat tartalmaztak (például GAAANGGAAA), hanem az összes ISRE variáns alulreprezentált az IRF5-domináns klaszterben. Következő megállapításunk, hogy a speciális ISRE-félhelyek mint például az 5'-GAGA-3' és az 5'-GACA-3' feldúsultak az IRF5-domináns klaszterben a többi klaszterhez képest. További vizsgálatokra van szükség annak a feltevésnek és molekuláris mechanizmusnak a bizonyítására, amely szerint az IRF5 kötődik a speciális 6-merekhez, és hogy az IRF5 fehérjék monomerekként képesek-e megkötni ezeket az ISRE-félhelyeket. Végül azt találtuk, hogy az NF- $\kappa$ B motívum feldúsul az IRF5-domináns klaszterben és ez összhangban volt azzal a megfigyeléssel, hogy az IRF5-kötés nagyrészt az NF- $\kappa$ B-vel való interakcióin alapszik (153).

Eredményeink azt mutatták, hogy az IRF3 és az IRF9 domináns régiók jobban hasonlítottak egymáshoz, és az IRF3 és az IRF9 dominancia kevésbé volt prediktálható. Számos oka lehet annak, hogy a gépi tanulással az előrejelzés alacsonyabb pontosságú. A klaszterezés pontatlan lehet a CHIP hatékonyságának különbségei vagy más okok miatt. A pontos predikcióhoz olyan jellemzőkre is szükség lehet melyeket nem vizsgáltunk. Az ilyen hiányzó nem vizsgált jellemzők lehetnek a motívumok száma egy adott régióban, a különböző motívumok közötti távolság, a transzkripció faktorok lefedettségi értékei, további motívumok jelenléte vagy az ISRE és a 6-merek további variánsai. A jövőben egy összetettebb elemzés felfedhet további jellemzőket is, amelyekre szükség lehet a pontosabb predikcióhoz. Elemzésünk során nem azonosítottunk olyan mintázatokat, amelyek előnyben részesítik az IRF3-domináns vagy az IRF9-domináns kötődést.

Az IRF3-domináns klaszterben azt találtuk, hogy a kötő régiók közül a stimuláció előtt kevesebb volt a nyitott kromatin régiók száma. Az NF- $\kappa$ B, AICE, TRE és CRE motívumok nagy frekvenciája a klaszterben arra enged következtetni, hogy az IRF3 más társfaktorokkal való együttműködést igényel a kromatin „megnyitásához”. Alternatív megoldás lehet három vagy négy IRF3 vagy más IRF tandem-kötődése a TISRE motívumhoz, amely szintén feldúsul a klaszterben és ez elegendő lehet a nukleoszóma eltávolításához. Az IRF9 nem köti nagy affinitással az IRF3-domináns kötő régiókat, valószínűleg azért, mert az NF- $\kappa$ B és AP-1 nem indukálódik az I-IFN útvonalon. Továbbá azt találtuk, hogy sok IRF9-domináns klaszterben feldúsulnak az ISRE és GAS motívumok. Az 5-WBVGGAAANNGAAACT-3 (133) konszenzusszekvencia és variánsai is feldúsultak az IRF9-domináns klaszterben, viszont előfordulási gyakoriságuk alacsony volt. A GAS-motívum feldúsulása arra enged következtetni, hogy az I-IFN jelátvitel által aktivált STAT1 homodimerek fontos meghatározói az IRF9-domináns kötés kialakulásának.

A második tanulmányunkban (146) az effektor ISG-k szabályozó elemeit vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a legtöbb effektor ISG (81,0%, 37 génből 30) promóter régiója olyan ISGF3-

kötő régióval rendelkezik, amely erős ISRE-motívumot tartalmaz, és számos sejttípusban hozzáférhető. A promóterrégiók nemcsak az általános TF-ek számára tartalmazhatnak kötőhelyeket, hanem promóter-specifikus TF-ek (például SP-1, YY-1 és NFY), LDTF-ek és más TF-ek számára is. A DNS-szekvenciák mellett a genomi régiók hozzáférhetősége kulcsfontosságú az SRTF-kötések kialakításánál. Azok a promóterek, amelyeket promóter-specifikus TF-ek tesznek hozzáférhetővé (nyitottá), azok nem függenek az LDTF-ektől, tehát sejttípus-függetlenül aktiválhatóak. Az IRF9 maga is fontos szerepet játszik az ISG-k promóter-régióinak nyitásában, ugyanis számos promóterben (pl. az Mx1, Mx2, Oas1a és Oas2 promóterei), ahol az IRF9 kötődött nyugvó vad típusú (wild type, WT) makrofágokban, a kromatin hozzáférhetősége csökkent az *Irf9*<sup>-/-</sup> sejtekben (109, 138, 139).

Az effektor ISG-k csak egy kisebb része (23,0%, 39 génből 9) kapcsolódott két vagy több TSS-disztális elemhez. A TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötőhelyek bizonyos szempontból különböztek. Az ISRE motívumok erőssége és gyakorisága a TSS-disztális IRF9-kötő régiókban alacsonyabb volt, mint a TSS-proximális régiókban. A „gyengébb” ISRE-motívumok alacsonyabb IRF9-kötéssel párosultak. Ezenkívül nyitottságuk inkább sejttípus-specifikus volt, mint a TSS-proximális csúcsok nyitottsága. Mivel az ISGF3 főként a már meglévő, hozzáférhető szabályozó régiókhoz kötődik, valószínűleg az ISGF3 különböző sejttípusokban különböző TSS-disztális szabályozó régiókat foglal el.

## 7. Összefoglalás

Első tanulmányunkban azokat a jellemzőket határoztuk meg, amelyek lehetővé teszik, hogy az IRF-ek specifikus genomi helyeken kötődjenek. Az IRF3, IRF5 vagy IRF9 által kötött régiók azonosítására ChIP-seq kísérleteket végeztünk aktivált egér dendritikus sejtekben. Az azonosított régiókat a DNS-motívumok feldúsulása, az interferon-stimulált válaszadó elem (ISRE) és az ISRE félhelyek, valamint a kromatin hozzáférhetősége szempontjából elemeztük. Gépi tanulási módszerrel vizsgáltuk az IRF-dominancia kiszámíthatóságát. Megállapítottuk, hogy az IRF5-domináns régiók alapvetően különböztek az IRF3- és IRF9-domináns régióktól: az ISRE-k ritkák, míg az NF $\kappa$ B-motívum és a speciális ISRE-félhelyek, mint például az 5'-GAGA-3' és az 5'-GACA-3' gyakrabban fordultak elő. Az IRF3- és IRF9-domináns régiókat a feldúsult ISRE motívum és a nyitott kromatin alacsonyabb gyakorisága jellemezte. Az IRF3- vagy IRF9-domináns régiók kevésbé voltak szétválaszthatóak, de például az ISRE néhány speciális változata, a TISRE és az NF- $\kappa$ B motívumai az IRF3 esetében, valamint a GAS motívum és bizonyos ISRE változatok az IRF9 esetében nagyobb gyakorisággal fordultak elő.

Második vizsgálatunkban többféle omikai megközelítést alkalmaztunk azon (epi)genetikai jellemzők azonosítására, amelyek lehetővé teszik az IFN-indukálható antivirális effektorok robosztus és általános, több sejtben megvalósuló transzkripció szabályozását. Meghatároztuk a szabályozó elemek elhelyezkedését, a DNS-motívumokat, az ISGF3 alegységeket (IRF9-STAT1-STAT2) és egyéb transzkripció faktorok kötését, valamint a kromatin nyitottságát egér dendritikus sejtekben. Az ISRE és a TISRE elemek az effektor ISG-k szabályozó elemeiben gyakrabban fordultak elő, mint más vizsgált ISG csoportokban. A kromatin nyitottsága a promóter régiókban hasonló volt a legtöbb más ISG-hez, de magasabb, mint a gyulladásal kapcsolatos citokinek promótereinél, amelyeket referencia génkészletként használtak. A legtöbb effektor ISG-nek (81,1%) volt legalább egy ISGF3-kötőhelye a transzkripció starthelyéhez (TSS) közel, és az effektor ISG-k csak egy részhalmaza (24,3%) kapcsolódott három vagy több IRF9-kötő régióhoz. Az IRF9 jelek jellemzően magasabbak voltak, az ISRE motívumok pedig „erősebbek” a TSS-proximális, mint a TSS-disztális szabályozó régiókban. Ezen kívül a legtöbb promóter régió több sejttypusban is nyitott volt a stimuláció előtt. Eredményeink azt mutatják, hogy az „erős” ISRE motívumok és az univerzálisan nyitott promóter régiók az effektor ISG-k fontos jellemzői.

## 8. Summary

In our first study, we determined the features mediating IRF-specific enhancer selection. To identify regions occupied predominantly by IRF3, IRF5 or IRF9, we performed ChIP-seq experiments in activated murine DCs. The identified regions were analysed with respect to the enrichment of DNA motifs, ISRE and ISRE half-site variants, and chromatin accessibility. Using a machine learning method, we investigated the predictability of IRF-dominance. We found that IRF5-dominant regions differed fundamentally from the IRF3- and IRF9-dominant regions: ISREs were rare, while the NFkB motif and special ISRE half-sites, such as 5'-GAGA-3' and 5'-GACA-3', were enriched. IRF3- and IRF9-dominant regions were characterized by enriched ISRE motif and lower frequency of accessible chromatin. The IRF3- or IRF9-dominant regions were similar to each other, but for example some special ISRE variants, the TISRE and NFkB motifs were more frequent in case of IRF3, while GAS motifs and certain ISRE variants in case of IRF9.

In our second study, we used a multi-omics approach to identify the (epi)genetic features that permit robust and widespread transcriptional regulation of IFN-inducible antiviral effectors. We determined the location of regulatory elements, the DNA motifs, the occupancy of ISGF3 subunits (IRF9-STAT1-STAT2) and other transcription factors, and the chromatin accessibility in murine DCs. The ISRE and TISRE occurred more frequently in the regulatory elements of effector ISGs than in any other tested ISG subsets. Chromatin accessibility at their promoter regions was similar to most other ISGs but higher than at the promoters of inflammation-related cytokines, which were used as a reference gene set. Most effector ISGs (81.1%) had at least one ISGF3 binding site proximal to TSS, and only a subset of effector ISGs (24.3%) was associated with three or more IRF9 binding regions. The IRF9 signals were typically higher and ISRE motifs were 'stronger' in TSS-proximal versus TSS-distal regulatory regions. Moreover, most TSS-proximal regulatory regions were accessible before stimulation in multiple cell types. Our results indicate that 'strong' ISRE motifs and universally accessible promoter regions that permit robust, widespread induction are characteristic features of effector ISGs.

## **9. Kulcsszavak**

ChIP-seq, dendritikus sejt (dendritic cell), IRF, ISRE, transzkripció faktor (transcription factor)

## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni témavezetőmnek Dr. Széles Lajosnak, a PhD képzésem során nyújtott folyamatos iránymutatásáért. Köszönöm az értékes elméleti és gyakorlati tanácsait és hogy minden körülmények között támogatta és türelemmel kísérte végig munkámat. Szeretném megköszönni a Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola korábbi vezetőinek Prof. Dr. Fésüs Lászlónak és Prof. Dr. Tózsér Józsefnek, és jelenlegi vezetőjének Prof. Dr. Balogh Istvánnak, hogy PhD tanulmányaimat és kutatómunkámat a doktori iskola keretein belül végezhettem.

Továbbá köszönöm Dr. Zahuczky Gábornak, hogy lehetővé tette a PhD képzés elkezdését és az első két évben témavezetőként nyújtott segítséget. Külön szeretném megköszönni Dr. Pólska Szilárdnak az MSc és PhD képzésem alatt nyújtott értékes szakmai tanácsait. Szeretném köszönetemet kifejezni közeli munkatársaimnak Göczi Lorándnak, Monori Fannynak, Csermely Attilának, Dr. Erdős Edinának és Dr. Nagy-Bojcsuk Dórának, akik folyamatos szakmai segítséget nyújtottak munkáim során. Köszönetemet szeretném kifejezni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet jelenlegi és korábbi munkatársainak: Ixchelt Cuaranta Monroy-nak, Dr. Nagy Gergőnek, Dr. Horváth Attilának, Dr. Ozgyin Lillának, Mátyás Erzsébetnek, Balogh Máriának, Fürtös Ibolyának és Silye-Cseh Tímeának, akik sok hasznos tanáccsal láttak el a kutatómunkám során. Köszönettel tartozom a Debreceni Egyetem Humángenetikai Tanszék korábbi vezetőjének Prof. Nagy Bálintnak és további munkatársainak, Dr. Szilágyi-Bónizs Melindának, Dr. Márton-Deme Évának és Magyarné Trefán Katalinnak a laboratóriumi munkámban nyújtott támogatásukért. Köszönöm Dr. Kádas Jánosnak az UD-GENOMED Medical Genomic Technologies Kutatás-fejlesztési és Szolgáltató Kft. ügyvezető igazgatójának, hogy támogatta a PhD tanulmányaim befejezését.

Hálával tartozom családomnak és barátaimnak. Köszönöm szüleimnek a türelmet, hogy végig kísérték ezen az úton is. Köszönöm gyermekemnek és férjemnek, hogy velem voltak, szeretetükkel támogattak munkáim során és mindig jobbra ösztönöztek.

## 11. Irodalomjegyzék

1. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142–62.
2. Steinman, R. M., and J. Banchereau. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419–426.
3. Reis E Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476–483.
4. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Théry, and S. Amigorena. 2002. A NTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS . *Annu Rev Immunol* 20: 621–667.
5. Trombetta, E. S., and I. Mellman. 2005. CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PROCESSING IN VITRO AND IN VIVO. *Annu Rev Immunol* 23: 975–1028.
6. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2: 151–161.
7. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (1979)* 327: 291–295.
8. Perussia, B., V. Fanning, and G. Trinchieri. 1985. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 4: 120–137.
9. Reizis, B., A. Bunin, H. S. Ghosh, K. L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid Dendritic Cells: Recent Progress and Open Questions. *Annu Rev Immunol* 29: 163–183.
10. Doebel, T., B. Voisin, and K. Nagao. 2017. Langerhans Cells – The Macrophage in Dendritic Cell Clothing. *Trends Immunol* 38: 817–828.
11. West, H. C., and C. L. Bennett. 2018. Redefining the Role of Langerhans Cells As Immune Regulators within the Skin. *Front Immunol* 8.
12. León, B., M. López-Bravo, and C. Ardavín. 2005. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* 17: 313–318.
13. Belz, G. T., and S. L. Nutt. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 12: 101–113.
14. Liu, K., and M. C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234: 45–54.
15. Gao, G. F., and B. K. Jakobsen. 2000. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: The molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today* 21: 630–636.

16. Pooley, J. L., W. R. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8<sup>-</sup> dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Immunol* 166: 5327–30.
17. Den Haan, J. M. M., S. M. Lehar, and M. J. Bevan. 2000. CD8<sup>+</sup> but not CD8<sup>-</sup> dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 192: 1685–1695.
18. Allenspach, E. J., M. P. Lemos, P. M. Porrett, L. A. Turka, and T. M. Laufer. 2008. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* 29: 795–806.
19. Maraskovsky, E., E. Daro, E. Roux, M. Teepe, C. R. Maliszewski, J. Hoek, D. Caron, M. E. Lebsack, and H. J. McKenna. 2000. In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96: 878–884.
20. Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322: 1097–100.
21. Shortman, K., and W. R. Heath. 2010. The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset. *Immunol Rev* 234: 18–31.
22. Garcia, K. C., C. A. Scott, A. Brunmark, F. R. Carbone, P. A. Peterson, I. A. Wilson, and L. Teyton. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 384: 577–581.
23. Edelson, B. T., K. C. Wumesh, R. Juang, M. Kohyama, L. A. Benoit, P. A. Klekotka, C. Moon, J. C. Albring, W. Ise, D. G. Michael, D. Bhattacharya, T. S. Stappenbeck, M. J. Holtzman, S. S. J. Sung, T. L. Murphy, K. Hildner, and K. M. Murphy. 2010. Peripheral CD103<sup>+</sup> dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 207: 823–836.
24. Fuertes Marraco, S. A., F. Grosjean, A. Duval, M. Rosa, C. Lavanchy, D. Ashok, S. Haller, L. A. Otten, Q. G. Steiner, P. Descombes, C. A. Lubet, F. Meissner, M. Mann, L. Szeles, W. Reith, and H. Acha-Orbea. 2012. Novel murine dendritic cell lines: A powerful auxiliary tool for dendritic cell research. *Front Immunol* 3: 331.
25. Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O’Keeffe. 2001. Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166: 5448–55.
26. Széles, L., F. Meissner, I. Dunand-Sauthier, C. Thelemann, M. Hersch, S. Singovski, S. Haller, F. Gobet, S. A. Fuertes Marraco, M. Mann, D. Garcin, H. Acha-Orbea, and W. Reith.

2015. TLR3-Mediated CD8<sup>+</sup> Dendritic Cell Activation Is Coupled with Establishment of a Cell-Intrinsic Antiviral State. *The Journal of Immunology* 195: 1025–1033.
27. Heinz, S., C. E. Romanoski, C. Benner, and C. K. Glass. 2015. The selection and function of cell type-specific enhancers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 144–154.
28. Xia, X. 2012. Position Weight Matrix, Gibbs Sampler, and the Associated Significance Tests in Motif Characterization and Prediction. *Scientifica (Cairo)* 2012: 1–15.
29. Buenrostro, J. D., B. Wu, H. Y. Chang, and W. J. Greenleaf. 2015. ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr Protoc Mol Biol* 109: 21.29.1–9.
30. Horvath, A., B. Daniel, L. Szeles, I. Cuaranta-Monroy, Z. Czimmerer, L. Ozgyin, L. Steiner, M. Kiss, Z. Simandi, S. Poliska, N. Giannakis, E. Raineri, I. G. Gut, B. Nagy, and L. Nagy. 2019. Labelled regulatory elements are pervasive features of the macrophage genome and are dynamically utilized by classical and alternative polarization signals. *Nucleic Acids Res* 47: 2778–2792.
31. Glass, C. K., and G. Natoli. 2016. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol* 17: 26–33.
32. Savitsky, D., T. Tamura, H. Yanai, and T. Taniguchi. 2010. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59: 489–510.
33. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6: 644–658.
34. Santana-de Anda, K., D. Gómez-Martín, M. Díaz-Zamudio, and J. Alcocer-Varela. 2011. Interferon regulatory factors: beyond the antiviral response and their link to the development of autoimmune pathology. *Autoimmun Rev* 11: 98–103.
35. Tamura, T., H. Yanai, D. Savitsky, and T. Taniguchi. 2008. The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annu Rev Immunol* 26: 535–584.
36. Antonczyk, A., B. Krist, M. Sajek, A. Michalska, A. Piaszyk-Borychowska, M. Plens-Galaska, J. Wesoly, and H. A. R. Bluyssen. 2019. Direct inhibition of IRF-dependent transcriptional regulatory mechanisms associated with disease. *Front Immunol* 10.
37. Petro, T. M. 2020. IFN Regulatory Factor 3 in Health and Disease. *The Journal of Immunology* 205: 1981–1989.
38. Tanaka, N., T. Kawakami, and T. Taniguchi. 1993. Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system. *Mol Cell Biol* 13: 4531–8.

39. Levy, D. E., D. S. Kessler, R. Pine, N. Reich, and J. E. Darnell. 1988. Interferon-induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control. *Genes Dev* 2: 383–393.
40. Escalante, C. R., J. Yie, D. Thanos, and A. K. Aggarwal. 1998. Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature* 391: 103–106.
41. Fujii, Y., T. Shimizu, M. Kusumoto, Y. Kyogoku, T. Taniguchi, and T. Hakoshima. 1999. Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J* 18: 5028–41.
42. Meraro, D., M. Gleit-Kielmanowicz, H. Hauser, and B.-Z. Levi. 2002. IFN-Stimulated Gene 15 Is Synergistically Activated Through Interactions Between the Myelocyte/Lymphocyte-Specific Transcription Factors, PU.1, IFN Regulatory Factor-8/IFN Consensus Sequence Binding Protein, and IFN Regulatory Factor-4: Characterization of a New Subtype of IFN-Stimulated Response Element. *The Journal of Immunology* 168: 6224–6231.
43. Nagulapalli, S., and M. L. Atchison. 1998. Transcription factor Pip can enhance DNA binding by E47, leading to transcriptional synergy involving multiple protein domains. *Mol Cell Biol* 18: 4639–50.
44. Marecki, S., and M. J. Fenton. 2000. PU.1/Interferon Regulatory Factor interactions: mechanisms of transcriptional regulation. *Cell Biochem Biophys* 33: 127–48.
45. Fu, X. Y., D. S. Kessler, S. A. Veals, D. E. Levy, and J. E. Darnell. 1990. ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 8555–9.
46. Schindler, C., D. E. Levy, and T. Decker. 2007. JAK-STAT Signaling: From Interferons to Cytokines. *Journal of Biological Chemistry* 282: 20059–20063.
47. Rogatsky, I., U. Chandrasekaran, M. Manni, W. Yi, and A. B. Pernis. 2014. Epigenetics and the IRFs: a complex interplay in the control of immunity and autoimmunity. *Autoimmunity* 47: 242–55.
48. Darnell, J. E., I. M. Kerr, and G. R. Stark. 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science (1979)* 264: 1415–1421.
49. Mancino, A., A. Termanini, I. Barozzi, S. Ghisletti, R. Ostuni, E. Prosperini, K. Ozato, and G. Natoli. 2015. A dual cis-regulatory code links IRF8 to constitutive and inducible gene expression in macrophages. *Genes Dev* 29: 394–408.
50. Mould, A. W., M. A. J. Morgan, A. C. Nelson, E. K. Bikoff, and E. J. Robertson. 2015. Blimp1/Prdm1 Functions in Opposition to Irf1 to Maintain Neonatal Tolerance during Postnatal Intestinal Maturation. *PLoS Genet* 11.

51. Kanno, Y., B.-Z. Levi, T. Tamura, and K. Ozato. 2005. Immune Cell-Specific Amplification of Interferon Signaling by the IRF-4/8-PU.1 Complex. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25: 770–779.
52. Tamura, T., P. Thotakura, T. S. Tanaka, M. S. H. Ko, and K. Ozato. 2005. Identification of target genes and a unique cis element regulated by IRF-8 in developing macrophages. *Blood* 106: 1938–47.
53. Li, P., R. Spolski, W. Liao, L. Wang, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and W. J. Leonard. 2012. BATF–JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature* 490: 543–546.
54. Tussiwand, R., W. L. Lee, T. L. Murphy, M. Mashayekhi, W. Kc, J. C. Albring, A. T. Satpathy, J. A. Rotondo, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, X. Wu, L. A. Weiss, E. Glasmacher, P. Li, W. Liao, M. Behnke, S. S. K. Lam, C. T. Aurrthur, W. J. Leonard, H. Singh, C. L. Stallings, L. David Sibley, R. D. Schreiber, and K. M. Murphy. 2012. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490: 502–507.
55. Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. MacE, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkurst, M. Muratet, K. M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F. K. Kirigin, C. Birchmeier, E. F. Wagner, K. M. Murphy, R. M. Myers, R. Bonneau, and D. R. Littman. 2012. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151: 289–303.
56. Iwata, A., V. Durai, R. Tussiwand, C. G. Briseño, X. Wu, G. E. Grajales-Reyes, T. Egawa, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2017. Quality of TCR signaling determined by differential affinities of enhancers for the composite BATF-IRF4 transcription factor complex. *Nat Immunol* 18: 563–572.
57. Glasmacher, E., S. Agrawal, A. B. Chang, T. L. Murphy, W. Zeng, B. Vander Lugt, A. A. Khan, M. Ciofani, C. J. Spooner, S. Rutz, J. Hackney, R. Nurieva, C. R. Escalante, W. Ouyang, D. R. Littman, K. M. Murphy, and H. Singh. 2012. A Genomic Regulatory Element That Directs Assembly and Function of Immune-Specific AP-1-IRF Complexes. *Science (1979)* 338: 975–980.
58. Doyle, S. E., S. A. Vaidya, R. O’Connell, H. Dadgostar, P. W. Dempsey, T. T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. E. Haberland, R. L. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity* 17: 251–263.
59. Jiang, Z., T. W. Mak, G. Sen, and X. Li. 2004. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF- $\kappa$ B and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN- $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 3533–3538.
60. Negishi, H., H. Yanai, A. Nakajima, R. Koshiba, K. Atarashi, A. Matsuda, K. Matsuki, S. Miki, T. Doi, A. Aderem, J. Nishio, S. T. Smale, K. Honda, and T. Taniguchi. 2012. Cross-

- interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* 13: 659–666.
61. Hiscott, J., and R. Lin. 2005. IRF-3 releases its inhibitions. *Structure* 13: 1235–1236.
  62. McWhirter, S. M., K. A. Fitzgerald, J. Rosains, D. C. Rowe, D. T. Golenbock, and T. Maniatis. 2004. IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 233–238.
  63. Mori, M., M. Yoneyama, T. Ito, K. Takahashi, F. Inagaki, and T. Fujita. 2004. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* 279: 9698–702.
  64. Tong, A.-J., X. Liu, B. J. Thomas, M. M. Lissner, M. R. Baker, M. D. Senagolage, A. L. Allred, G. D. Barish, and S. T. Smale. 2016. A Stringent Systems Approach Uncovers Gene-Specific Mechanisms Regulating Inflammation. *Cell* 165: 165–179.
  65. Borden, E. C., G. C. Sen, G. Uze, R. H. Silverman, R. M. Ransohoff, G. R. Foster, and G. R. Stark. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6: 975–990.
  66. McNab, F., K. Mayer-Barber, A. Sher, A. Wack, and A. O’Garra. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15: 87–103.
  67. Marques, R. E., R. Guabiraba, R. C. Russo, and M. M. Teixeira. 2013. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* 17: 1439–1460.
  68. Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, and A. D. Luster. 2002. IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *The Journal of Immunology* 168: 3195–3204.
  69. Chang Foreman, H.-C., S. Van Scoy, T.-F. Cheng, and N. C. Reich. 2012. Activation of interferon regulatory factor 5 by site specific phosphorylation. *PLoS One* 7: e33098.
  70. Sharma, S., B. R. TenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* (1979) 300: 1148–1151.
  71. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. I. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243–249.
  72. Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, and I. A. Udalova. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12: 231–8.
  73. Vignali, D. A. A., and V. K. Kuchroo. 2012. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 13: 722–728.

74. Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487–501.
75. Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg, and D. A. A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450: 566–569.
76. DECKER, T., P. KOVARIK, and A. MEINKE. 1997. GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 17: 121–134.
77. Ivashkiv, L. B., and L. T. Donlin. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14: 36–49.
78. Horvath, C. M. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 25: 496–502.
79. Paul, A., T. H. Tang, and S. K. Ng. 2018. Interferon regulatory factor 9 structure and regulation. *Front Immunol* 9, 1831.
80. Rengachari, S., S. Groiss, J. M. Devos, E. Caron, N. Grandvaux, and D. Panne. 2018. Structural basis of STAT2 recognition by IRF9 reveals molecular insights into ISGF3 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E601–E609.
81. Platanitis, E., D. Demiroz, A. Schneller, K. Fischer, C. Capelle, M. Hartl, T. Gossenreiter, M. Müller, M. Novatchkova, and T. Decker. 2019. A molecular switch from STAT2-IRF9 to ISGF3 underlies interferon-induced gene transcription. *Nat Commun* 10: 2921.
82. Majoros, A., E. Platanitis, E. Kernbauer-Hölzl, F. Rosebrock, M. Müller, and T. Decker. 2017. Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK-STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Front Immunol* 8: 29.
83. Mesev, E. v., R. A. LeDesma, and A. Ploss. 2019. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol* 4: 914–924.
84. Mostafavi, S., H. Yoshida, D. Moodley, H. LeBoité, K. Rothamel, T. Raj, C. J. Ye, N. Chevrier, S.-Y. Zhang, T. Feng, M. Lee, J.-L. Casanova, J. D. Clark, M. Hegen, J.-B. Telliez, N. Hacohen, P. L. De Jager, A. Regev, D. Mathis, and C. Benoist. 2016. Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. *Cell* 164: 564–578.
85. Au-Yeung, N., and C. M. Horvath. 2018. Transcriptional and chromatin regulation in interferon and innate antiviral gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 44: 11–17.
86. Wang, W., L. Xu, J. Su, M. P. Peppelenbosch, and Q. Pan. 2017. Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends Microbiol* 25: 573–584.
87. Platanitis, E., and T. Decker. 2018. Regulatory Networks Involving STATs, IRFs, and NFκB in Inflammation. *Front Immunol* 9: 2542.

88. van Tol, S., A. Hage, M. I. Giraldo, P. Bharaj, and R. Rajsbaum. 2017. The TRIMendous role of TRIMs in virus-host interactions. *Vaccines (Basel)* 5.
89. Suprunenko, T., and M. J. Hofer. 2016. The emerging role of interferon regulatory factor 9 in the antiviral host response and beyond. *Cytokine Growth Factor Rev* 29: 35–43.
90. Schoggins, J. W., and C. M. Rice. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1: 519–525.
91. MacMicking, J. D. 2012. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12: 367–382.
92. Taylor, R. T., K. J. Lubick, S. J. Robertson, J. P. Broughton, M. E. Bloom, W. A. Bresnahan, and S. M. Best. 2011. TRIM79 $\alpha$ , an interferon-stimulated gene product, restricts tick-borne encephalitis virus replication by degrading the viral RNA polymerase. *Cell Host Microbe* 10: 185–96.
93. Schoggins, J. W. 2019. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* 6: 567–584.
94. Barish, G. D., R. T. Yu, M. Karunasiri, C. B. Ocampo, J. Dixon, C. Benner, A. L. Dent, R. K. Tangirala, and R. M. Evans. 2010. Bcl-6 and NF- $\kappa$ B cistromes mediate opposing regulation of the innate immune response. *Genes Dev* 24: 2760–2765.
95. Csumita, M., A. Csermely, A. Horvath, G. Nagy, F. Monori, L. Göczi, H.-A. Orbea, W. Reith, and L. Széles. 2019. Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5' and 3' flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin environment in a combinatorial fashion. *Nucleic Acids Res* .
96. Daniel, B., G. Nagy, N. Hah, A. Horvath, Z. Czimmerer, S. Poliska, T. Gyuris, J. Keirsse, C. Gysemans, J. A. van Ginderachter, B. L. Balint, R. M. Evans, E. Barta, and L. Nagy. 2014. The active enhancer network operated by liganded RXR supports angiogenic activity in macrophages. *Genes Dev* 28: 1562–1577.
97. Siersbaek, M. S., A. Loft, M. M. Aagaard, R. Nielsen, S. F. Schmidt, N. Petrovic, J. Nedergaard, and S. Mandrup. 2012. Genome-Wide Profiling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Primary Epididymal, Inguinal, and Brown Adipocytes Reveals Depot-Selective Binding Correlated with Gene Expression. *Mol Cell Biol* 32: 3452–3463.
98. Barta, E. 2011. Command line analysis of ChIP-seq results. *EMBNet.journal; Vol 17, No 1: Next Generation Sequencing Data Analysis* DO - 10.14806/ej.17.1.209 .
99. Li, H., and R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754–1760.

100. Zhang, Y., T. Liu, C. A. Meyer, J. Eeckhoute, D. S. Johnson, B. E. Bernstein, C. Nussbaum, R. M. Myers, M. Brown, W. Li, and X. S. Liu. 2008. Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9: R137.
101. ENCODE Project Consortium, T. E. P. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57–74.
102. Thorvaldsdóttir, H., J. T. Robinson, and J. P. Mesirov. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14: 178–92.
103. Heinz, S., C. Benner, N. Spann, E. Bertolino, Y. C. Lin, P. Laslo, J. X. Cheng, C. Murre, H. Singh, and C. K. Glass. 2010. Simple Combinations of Lineage-Determining Transcription Factors Prime cis-Regulatory Elements Required for Macrophage and B Cell Identities. *Mol Cell* 38: 576–589.
104. Yoshida, H., C. A. Lareau, R. N. Ramirez, S. A. Rose, B. Maier, A. Wroblewska, F. Desland, A. Chudnovskiy, A. Mortha, C. Dominguez, J. Tellier, E. Kim, D. Dwyer, S. Shinton, T. Nabekura, Y. L. Qi, B. Yu, M. Robinette, K. W. Kim, A. Wagers, A. Rhoads, S. L. Nutt, B. D. Brown, S. Mostafavi, J. D. Buenrostro, and C. Benoist. 2019. The cis-Regulatory Atlas of the Mouse Immune System. *Cell* 176: 897-912.e20.
105. Tong, A.-J., X. Liu, B. J. Thomas, M. M. Lissner, M. R. Baker, M. D. Senagolage, A. L. Allred, G. D. Barish, and S. T. Smale. 2016. A Stringent Systems Approach Uncovers Gene-Specific Mechanisms Regulating Inflammation. *Cell* 165: 165–179.
106. Saliba, D. G., A. Heger, H. L. Eames, S. Oikonomopoulos, A. Teixeira, K. Blazek, A. Androulidaki, D. Wong, F. G. Goh, M. Weiss, A. Byrne, M. Pasparakis, J. Ragoussis, and I. A. Udalova. 2014. IRF5:RelA interaction targets inflammatory genes in macrophages. *Cell Rep* 8: 1308–17.
107. Chow, K. T., C. Driscoll, Y.-M. Loo, M. Knoll, and M. Gale Jr. 2018. IRF5 regulates unique subset of genes in dendritic cells during West Nile virus infection. *J Leukoc Biol* .
108. Uhlenhaut, N. H., G. D. Barish, R. T. Yu, M. Downes, M. Karunasiri, C. Liddle, P. Schwalie, N. Hübner, and R. M. Evans. 2013. Insights into Negative Regulation by the Glucocorticoid Receptor from Genome-wide Profiling of Inflammatory Cistromes. *Mol Cell* 49: 158–171.
109. Platanitis, E., S. Gruener, A. Ravi Sundar Jose Geetha, L. Boccuni, A. Vogt, M. Novatchkova, A. Sommer, I. Barozzi, M. Müller, and T. Decker. 2022. Interferons reshape the 3D conformation and accessibility of macrophage chromatin. *iScience* 25: 103840.
110. Negishi, H., H. Yanai, A. Nakajima, R. Koshiba, K. Atarashi, A. Matsuda, K. Matsuki, S. Miki, T. Doi, A. Aderem, J. Nishio, S. T. Smale, K. Honda, and T. Taniguchi. 2012. Cross-

- interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nat Immunol* 13: 659.
111. Panne, D., T. Maniatis, and S. C. Harrison. 2007. An Atomic Model of the Interferon- $\beta$  Enhanceosome. *Cell* 129: 1111–1123.
  112. Nakaya, T., M. Sato, N. Hata, M. Asagiri, H. Suemori, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2001. *Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection*,. ; :1150–1156.
  113. Brass, A. L., A. Q. Zhu, and H. Singh. 1999. Assembly requirements of PU.1-Pip (IRF-4) activator complexes: Inhibiting function in vivo using fused dimers. *EMBO Journal* 18: 977–991.
  114. Eisenbeis, C. F., H. Singh, and U. Storb. 1995. Pip, a novel IRF family member, is a lymphoid-specific, PU.1-dependent transcriptional activator. *Genes Dev* 9: 1377–1387.
  115. De, S., B. Zhang, T. Shih, S. Singh, A. Winkler, R. Donnelly, and B. J. Barnes. 2018. B cell-intrinsic role for IRF5 in TLR9/BCR-induced human B cell activation, proliferation, and plasmablast differentiation. *Front Immunol* 8: 1–18.
  116. Tamura, T., P. Thotakura, T. S. Tanaka, M. S. H. Ko, and K. Ozato. 2005. Identification of target genes and a unique cis element regulated by IRF-8 in developing macrophages. *Blood* 106: 1938–47.
  117. Eferl, R., and E. F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3: 859–868.
  118. Siggers, T., A. B. Chang, A. Teixeira, D. Wong, K. J. Williams, B. Ahmed, J. Ragoussis, I. A. Udalova, S. T. Smale, and M. L. Bulyk. 2012. Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF- $\kappa$ B family DNA binding. *Nat Immunol* 13: 95–102.
  119. DECKER, T., P. KOVARIK, and A. MEINKE. 1997. GAS Elements: A Few Nucleotides with a Major Impact on Cytokine-Induced Gene Expression. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 17: 121–134.
  120. Horvath, C. M. 2000. STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals. *Trends Biochem Sci* 25: 496–502.
  121. Ivashkiv, L. B., and L. T. Donlin. 2014. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14: 36–49.
  122. Glasmacher, E., S. Agrawal, A. B. Chang, T. L. Murphy, W. Zeng, B. Vander Lugt, A. A. Khan, M. Ciofani, C. J. Spooner, S. Rutz, J. Hackney, R. Nurieva, C. R. Escalante, W. Ouyang, D. R. Littman, K. M. Murphy, and H. Singh. 2012. A Genomic Regulatory Element That Directs

Assembly and Function of Immune-Specific AP-1-IRF Complexes. *Science* (1979) 338: 975–980.

123. Tussiwand, R., W. L. Lee, T. L. Murphy, M. Mashayekhi, W. Kc, J. C. Albring, A. T. Satpathy, J. A. Rotondo, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, X. Wu, L. A. Weiss, E. Glasmacher, P. Li, W. Liao, M. Behnke, S. S. K. Lam, C. T. Aurther, W. J. Leonard, H. Singh, C. L. Stallings, L. David Sibley, R. D. Schreiber, and K. M. Murphy. 2012. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490: 502–507.

124. Li, P., R. Spolski, W. Liao, L. Wang, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and W. J. Leonard. 2012. BATF–JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. *Nature* 490: 543–546.

125. Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. MacE, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C. N. Parkurst, M. Muratet, K. M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F. K. Kirigin, C. Birchmeier, E. F. Wagner, K. M. Murphy, R. M. Myers, R. Bonneau, and D. R. Littman. 2012. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151: 289–303.

126. Iwata, A., V. Durai, R. Tussiwand, C. G. Briseño, X. Wu, G. E. Grajales-Reyes, T. Egawa, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2017. Quality of TCR signaling determined by differential affinities of enhancers for the composite BATF-IRF4 transcription factor complex. *Nat Immunol* 18: 563–572.

127. Mancino, A., A. Termanini, I. Barozzi, S. Ghisletti, R. Ostuni, E. Prosperini, K. Ozato, and G. Natoli. 2015. A dual cis-regulatory code links IRF8 to constitutive and inducible gene expression in macrophages. *Genes Dev* 29: 394–408.

128. Fujii, Y., T. Shimizu, M. Kusumoto, Y. Kyogoku, T. Taniguchi, and T. Hakoshima. 1999. Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *EMBO J* 18: 5028–41.

129. Mould, A. W., M. A. J. Morgan, A. C. Nelson, E. K. Bikoff, and E. J. Robertson. 2015. Blimp1/Prdm1 Functions in Opposition to Irf1 to Maintain Neonatal Tolerance during Postnatal Intestinal Maturation. *PLoS Genet* 11: e1005375.

130. Belz, G. T., and S. L. Nutt. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 12: 101–113.

131. Badis, G., M. F. Berger, A. A. Philippakis, S. Talukder, A. R. Gehrke, S. A. Jaeger, E. T. Chan, G. Metzler, A. Vedenko, X. Chen, H. Kuznetsov, C.-F. Wang, D. Coburn, D. E. Newburger, Q. Morris, T. R. Hughes, and M. L. Bulyk. 2009. Diversity and Complexity in DNA Recognition by Transcription Factors. *Science* (1979) 324: 1720–1723.

132. Andrienas, K. K., V. Ramlall, J. Kurland, B. Leung, A. G. Harbaugh, and T. Siggers. 2018. DNA-binding landscape of IRF3, IRF5 and IRF7 dimers: Implications for dimer-specific gene regulation. *Nucleic Acids Res* 46: 2509–2520.

133. Schmid, S., M. Mordstein, G. Kochs, A. García-Sastre, and B. R. TenOever. 2010. Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state. *Journal of Biological Chemistry* 285: 42013–42022.
134. Schmid, S., M. Mordstein, G. Kochs, A. García-Sastre, and B. R. TenOever. 2010. Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state. *Journal of Biological Chemistry* 285: 42013–42022.
135. Kaikkonen, M. U., N. J. Spann, S. Heinz, C. E. Romanoski, K. A. Allison, J. D. Stender, H. B. Chun, D. F. Tough, R. K. Prinjha, C. Benner, and C. K. Glass. 2013. Remodeling of the Enhancer Landscape during Macrophage Activation Is Coupled to Enhancer Transcription. *Mol Cell* 51: 310–325.
136. Ostuni, R., V. Piccolo, I. Barozzi, S. Polletti, A. Termanini, S. Bonifacio, A. Curina, E. Prosperini, S. Ghisletti, and G. Natoli. 2013. Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* 152: 157–171.
137. Ramirez-Carrozzi, V. R., D. Braas, D. M. Bhatt, C. S. Cheng, C. Hong, K. R. Doty, J. C. Black, A. Hoffmann, M. Carey, and S. T. Smale. 2009. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell* 138: 114–28.
138. Au-Yeung, N., and C. M. Horvath. 2018. Histone H2A.Z Suppression of Interferon-Stimulated Transcription and Antiviral Immunity Is Modulated by GCN5 and BRD2. *iScience* 6: 68–82.
139. Mostafavi, S., H. Yoshida, D. Moodley, H. Leboité, K. Rothamel, T. Raj, C. J. Ye, N. Chevrier, S. Y. Zhang, T. Feng, M. Lee, J. L. Casanova, J. D. Clark, M. Hegen, J. B. Telliez, N. Hacohen, P. L. De Jager, A. Regev, D. Mathis, and C. Benoist. 2016. Parsing the Interferon Transcriptional Network and Its Disease Associations. *Cell* 164: 564–578.
140. Smale, S. T., A. Tarakhovsky, and G. Natoli. 2014. Chromatin Contributions to the Regulation of Innate Immunity. *Annu Rev Immunol* 32: 489–511.
141. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6: 644–658.
142. Doyle, S. E., S. A. Vaidya, R. O’Connell, H. Dadgostar, P. W. Dempsey, T. T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. E. Haberland, R. L. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity* 17: 251–263.
143. Takaoka, A., H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S. I. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434: 243–249.

144. Krausgruber, T., K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, T. Hussell, M. Feldmann, and I. A. Udalova. 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol* 12: 231–238.
145. MacMicking, J. D. 2012. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 12: 367–382.
146. Göczi, L., M. Csumita, A. Horváth, G. Nagy, S. Póliska, M. Pigni, C. Thelemann, B. Dániel, H. Mianesaz, T. Varga, K. Sen, S. K. Raghav, J. W. Schoggins, L. Nagy, H. Acha-Orbea, F. Meissner, W. Reith, and L. Széles. 2022. A Multi-Omics Approach Reveals Features That Permit Robust and Widespread Regulation of IFN-Inducible Antiviral Effectors. *J Immunol* 209: 1930–1941.
147. Pennacchio, L. A., W. Bickmore, A. Dean, M. A. Nobrega, and G. Bejerano. 2013. Enhancers: Five essential questions. *Nat Rev Genet* 14: 288–295.
148. Gasperini, M., J. M. Tome, and J. Shendure. 2020. Towards a comprehensive catalogue of validated and target-linked human enhancers. *Nat Rev Genet* 21: 292–310.
149. Dogan, N., W. Wu, C. S. Morrissey, K. B. Chen, A. Stonestrom, M. Long, C. A. Keller, Y. Cheng, D. Jain, A. Visel, L. A. Pennacchio, M. J. Weiss, G. A. Blobel, and R. C. Hardison. 2015. Occupancy by key transcription factors is a more accurate predictor of enhancer activity than histone modifications or chromatin accessibility. *Epigenetics Chromatin* 8.
150. Daniel, B., G. Nagy, and L. Nagy. 2014. The intriguing complexities of mammalian gene regulation: How to link enhancers to regulated genes. Are we there yet? *FEBS Lett* 588: 2379–2391.
151. Chepelev, I., G. Wei, D. Wangsa, Q. Tang, and K. Zhao. 2012. Characterization of genome-wide enhancer-promoter interactions reveals co-expression of interacting genes and modes of higher order chromatin organization. *Cell Res* 22: 490–503.
152. Cheng, Q., F. Behzadi, S. Sen, S. Ohta, R. Spreafico, R. Teles, R. L. Modlin, and A. Hoffmann. 2019. Sequential conditioning-stimulation reveals distinct gene- and stimulus-specific effects of Type I and II IFN on human macrophage functions. *Sci Rep* 9: 5288.
153. Andrienas, K. K., V. Ramlall, J. Kurland, B. Leung, A. G. Harbaugh, and T. Siggers. 2018. DNA-binding landscape of IRF3, IRF5 and IRF7 dimers: Implications for dimer-specific gene regulation. *Nucleic Acids Res* 46: 2509–2520.
154. Inukai, S., K. H. Kock, and M. L. Bulyk. 2017. Transcription factor–DNA binding: beyond binding site motifs. *Curr Opin Genet Dev* 43: 110–119.

## 12. Függelék

### 12.1. Publikációs lista



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

Nyilvántartási szám: DEENK/458/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagyné Csumita Mária

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10057535

#### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Göczi, L., **Csumita, M.**, Horváth, A., Nagy, G., Pólska, S., Pigni, M., Thelemann, C., Dániel, B., Mianesaz, H., Varga, T., Sen, K., Raghav, S. K., Schoggins, J. W., Nagy, L., Acha-Orbea, H., Meissner, F., Reith, W., Széles, L.: A Multi-Omics Approach Reveals Features That Permit Robust and Widespread Regulation of IFN-Inducible Antiviral Effectors.  
*J. Immun.* 209 (9), 1-12, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2200363>  
IF: 5.426 (2021)
2. **Csumita, M.**, Csermely, A., Horváth, A., Nagy, G., Monori, F., Göczi, L., Orbea, H. A., Reith, W., Széles, L.: Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5' and 3' flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin environment in a combinatorial fashion.  
*Nucleic Acids Res.* 48 (2), 589-604, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz1112>  
IF: 16.971





**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

### **További közlemények**

3. Póliska, S., Besenyei, T., Végh, E., Hamar, A. B., Karancsiné Pusztai, A., Váncsa, A., Bodnár, N., Szamosi, S., **Csumita, M.**, Kerekes, G., Szabó, Z., Nagy, Z., Szűcs, G., Szántó, S., Zahuczky, G., Nagy, L., Szekanecz, Z.: Gene expression analysis of vascular pathophysiology related to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 21 (1), 94, 2019.  
IF: 4.103

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 26,5**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
22,397**

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, 2022.10.24.



## **12.2. PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények**