

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

***Humán plazmacitoid dendritikus sejtek: azonosításuktól
a specifikus antivirális funkcióik megismeréséig***

Dr. Magyarics Zoltán

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
DEBRECEN, 2015

HUMÁN PLAZMACITOID DENDRITIKUS SEJTEK: AZONOSÍTÁSUKTÓL A SPECIFIKUS ANTIVIRÁLIS FUNKCIÓIK MEGISMERÉSÉIG

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

Írta: Dr. Magyarics Zoltán
okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Bácsi Attila, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Dr. Kacs Kovics Imre, az MTA doktora
Dr. Kónya József, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Immunológiai Intézet,
Élettudományi Épület, 2.209 szoba
2015. július 1., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Nagy György, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora
Dr. Kacs Kovics Imre, az MTA doktora
Dr. Kónya József, PhD
Dr. Nagy György, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet "A" épület
tanterme
2015. július 1., 13 óra

1. Bevezetés

1.1. A plazmacitoid dendritikus sejtek legfőbb jellemzői

A dendritikus sejtek (DS-ek) a hematopoetikus sejtek egy igen heterogén sejtpopulációját alkotják, melyek professzionális antigen prezentáló sejtteként (APS) fontos kapcsolatot biztosítanak a természetes és adaptív immunválaszok között. Ezen sejtek funkcióinak, beleértve az antigén prezentációban betöltött szerepüknek a megismerése fontos mérföldkő volt az immunológiában. Eredetük, szöveti lokalizációjuk és funkcionális sajátosságaik alapján a humán DS-ek két fő csoportba sorolhatók: konvencionális DS-ek (cDS), illetve a később felfedezett plazmacitoid DS-ek (pDS-ek). A humán pDS-ek a perifériás vér mononukleáris sejtjeinek (PBMC) csupán 0,2%–0,8%-át teszik ki. Kisebbség (8–10 µm), mint a CD14⁺ monociták vagy a cDS-ek, viszont méretük a nyugvó limfocitáknál nagyobb és jellemző rájuk a plazmasejt morfológia, excentrikusan elhelyezkedő vese alakú sejtmaggal. Míg a CD11c⁺ vérben található, éretlen mieloid DS-ek nyúlványokkal rendelkeznek, addig az éretlen pDS-ek csak *in vitro* körülmények között, IL-3 jelenlétében fenntartva mutatnak DS morfológiát. A humán, éretlen pDS-ek fenotípusukat tekintve CD4⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺ CD123⁺⁺ ILT3⁺ ILT1⁻ CD11c⁻ lin⁻-ak. Ezen sejtek nem expresszálják az immunrendszer sejttypusaira jellemző specifikus markereket, beleértve a sejt felszíni és citoplazmatikus immunglobulinokat, a CD19-et (B sejt marker), a TCR-CD3 komplexet (T sejt marker), a CD14-et (monocita marker), CD16-ot és CD56-ot (NK sejt marker), valamint a CD11c-t (mieloid DS marker) sem. Az egér eredetű pDS-ek fenotípusát röviddel a humán pDS-ek felfedezését követően azonosították és B220⁺Ly49Q⁺CCR9⁺ sejtteként írták le őket.

Mielőtt tisztázódott volna a pDS-ek valódi eredete, addig számtalan elnevezés született ezen rejtélyes sejttypus elkülönítésére, beleértve a „T sejt-asszociált plazmasejt”, „plazmacitoid T sejt” vagy „plazmacitoid monocita” elnevezést. Végül a már korábban felfedezett hivatásos I-es típusú interferont termelő sejtteként (IPS) azonosították a pDS-eket. Hasonlóan a pDS-ek elnevezését övező bizonytalansághoz, a pDS-ek eredete is évtizedeken keresztül vitatott volt. A jelenlegi álláspont szerint a DS-ek fejlődési útvonalai igen nagy flexibilitást mutatnak, így a pDS-ek is közös mieloid, illetve közös limfoid előalakokból is egyaránt származhatnak.

1.2. A pDS-ek természetes immunválaszában szerepet játszó receptorok

A természetes immunitásnak kiemelkedő szerepe van a mikrobiális elemek felismerésében, mely komponensek nélkülözhetetlenek a mikroorganizmusok számára, ugyanakkor veszély szignált jelentenek a gazdaszervezetnek, beindítva ezáltal egy hatékony adaptív immunválaszt a szervezetbe jutó patogének ellen. A patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) felismerését a csírvonalban kódolt, állandóan kifejeződő mintázatfelismerő receptorok (PRR) teszik lehetővé. Hasonló mikrobiális struktúrák patogén, illetve nem patogén természetű mikrobákon is kifejeződhetnek. Ilyenkor az immunrendszernek különbséget kell tennie a káros, illetve a nem káros, azaz tolerálható mikrobiális elemek között, melyben igen fontos szerepet játszanak az olyan másodlagos veszély szignálok, mint például egy invazív baktérium vagy vírus fertőzés következtében kialakuló szövetkárosodás. Fontos kiemelni, hogy egyes PRR-ok saját struktúrákat is felismernek, amennyiben azok szöveti sérülés vagy kontrollálatlan sejthalál következtében hozzáférhetővé válnak az immunrendszer számára.

Eltérően más sejtípusoktól az APS-ek, úgymint a DS-ek, B sejtek és makrofágok a PAMP-ok felismerését lehetővé tevő PRR-ok széles repertoárjával rendelkeznek. A PRR-ok egyik fontos családja a sejt felszínen vagy az intracelluláris kompartmentek membránján lokalizálódó Toll-szerű receptorok (TLR). Napjainkig a TLR-ek 13 fajtáját azonosították, melyek közül 10 található meg az emberi szervezetben. A TLR-ek I-es típusú transzmembrán glikoproteinek, melyek különböző extracelluláris, illetve citoplazmatikus Toll/IL-1 receptor jelátviteli doménekkal rendelkeznek. A TLR-okon keresztüli aktiváció citokinek, kemokinek és kostimulatórikus molekulák kifejeződését indukálja a sejtekben, melyek egyaránt nélkülözhetetlenek a természetes immunválasz szabályozásában, valamint az adaptív immunválasz kiváltásában. A pDS-ek az RNS, illetve DNS vírusok felismerésére specializálódtak, mivel szelektíven fejezik ki a TLR-ek egy sajátos kombinációját, a TLR7-et és TLR9-et. A TLR7 virális, egyszálú (ss) RNS, valamint különböző szintetikus agonisták, úgymint loxoribin, resiquimod (R848) vagy imiquimod (R837) felismerését teszi lehetővé. A TLR9 metilátlan CpG szekvenciákban gazdag, virális dupla szálú (ds) DNS-t ismer fel, mely DNS szekvenciák nem jellemzőek az eukarióta genomi DNS-re. Továbbá szintetikus CpG oligo-dezoxi-ribonukleotidok (CpG ODN) is ligandjai lehetnek ezen receptornak. A pDS-ek, a

többi sejttípushoz képest, beleértve a cDS-eket is, TLR aktiválást követően 1000-szer több I-es típusú interferon (IFN), főként IFN- α és IFN- β termelésére képesek. A sejtek I-es típusú IFN válasza MyD88, IRAK, TRAF6 és IKK komplexek által szabályozott, mely jelátviteli útvonal az interferon regulatórikus faktor (IRF) 7 aktivációjához vezet, TLR7-en és TLR9-en keresztül történő aktiváció esetében egyaránt.

A TLR-eken kívül a NACHT-LRR-ek, a Nod-szerű receptorok (NLR) és a retinsav indukált gén (RIG)-szerű helikázok (RLH) is az intracelluláris PRR-ok tagjai. A DExD/H-box helikázok családjába tartozó RLH-k közé sorolhatók a RIG-I, a melanóma differenciáció-asszociált gén 5 (MDA5) és a Laboratory of Genetics and Physiology 2 (LGP2) receptorok. Ezen receptorok a TLR-ektől eltérően a citoplazmában lokalizálódnak, ahol az RNS vírusok replikációs intermediereinek felismerését teszik lehetővé. A RIG-I és MDA5 specifikus ligandjai konformáció változásokat idéznek elő a receptorok CARD jelátviteli doménjein, mely a szignalizációs útvonal aktivációjához és ezáltal az IRF3 és IRF7 transzkripció faktorok foszforilációjához vezet, ami I-es típusú IFN szekréciót eredményez. A RIG-I és MDA5 receptor természetes vírus eredetű ligandjaik mellett számos szintetikus molekula is képes aktiválni ezen receptorokat. A poli-ribo-inozin:poli-ribocitidin sav (poly I:C vagy pI:C) egy szintetikus dsRNS, ami TLR3 and RLH aktiváció révén I-es típusú IFN termelést indukál. A kereskedelmi forgalomban kapható hosszabb szekvenciájú pI:C felismerése MDA5 receptoron keresztül valósul meg, szemben a kb. 300 bázispár hosszúságú, részlegesen emésztett (specifikus RNázIII endonukleázsal) pI:C-val, mely RIG-I receptor aktiválására képes. A pI:C, mellett egy másik RNS szekvenciát, az 5'-trifoszfát tartalmú RNS-t (5'pppRNA) is a RIG-I receptor igen specifikus ligandjaként azonosították. Ezen RNS szekvencia az RNS vírusok genomjában, illetve replikációs termékeiben is egyaránt megtalálható.

Az RLH-k kifejeződése pDS-ekben, illetve funkcionális szerepük ezen sejtek immunválasza során kevésbé ismert. Egér eredetű pDS-eken végzett, korábbi tanulmányok szerint a pDS-ek főként a TLR-eket használják a vírusok felismerésére, szemben az RLH-ekkel. Az aktiválatlan humán pDS-ekben a RIG-I és az MDA5 receptor is igen alacsony szinten expresszálódik, valamint a sejtek specifikus RIG-I ligand (5'-trifoszfát RNS) általi aktivációja nem eredményez I-es típusú IFN termelődést. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy egyik korábbi tanulmány sem foglalkozik a TLR-ek, illetve RLH-k által mediált jelátviteli útvonalak

lehetséges kölcsönhatásaival. Így munkacsoportunk célul tűzte ki az endoszómális TLR aktiváció által indukált RIG-I expressziós változások tanulmányozását humán pDS-ekben.

1.3. Plazmacitoid dendritikus sejt leukémia/limfóma és pDS-eredetű sejtvonalak

A plazmacitoid dendritikus sejt leukémia/limfóma (pDS-L) egy igen ritka hematopoetikus malignus elváltozás, gyors és agresszív klinikai lefolyással. A klinikai tünetek izolált bőrléziók formájában jelentkeznek először, majd szisztémás disszemináció következtében a csontvelő, a perifériás vér, a nyirokcsomók és egyéb szövetek is érintetté válnak. Ezen kórképet elsőként hisztiocitás limfóma / hisztiocitákhoz kapcsolt hematológiai rosszindulatú elváltozásként vagy agranularis CD4⁺CD56⁺ kután limfóma / hematodermiaként írták le. A későbbiekben CD56 expressziója révén NK-sejtekhez kapcsolták és blasztos / blasztoid NK-sejtes leukémia vagy NK-limfóma / leukémia névvel illették. Bár több tanulmány is rávilágított a pDS-ek és a CD4⁺CD56⁺ tumoros elváltozások közötti lehetséges kapcsolatra, elsőként *Chaperot és munkatársai* igazolták a CD4/CD56 pozitivitást mutató leukémiás sejteknél a pDS-szerű fenotípust. A francia leukémiával foglalkozó munkacsoport (GEIL) által gyűjtött adatok alapján a pDS-eredetű limfómás / leukémiás esetek elnevezésére a „korai pDS leukémia/limfóma” nevet javasolták. A WHO és az Európai Rákkutató és Terápiás Szövetség (EORTC) végül a kután limfómák közé sorolta ezen kórképet és végső elnevezése CD4⁺/CD56⁺ haematodermiás neoplazma vagy "korai" plazmacitoid dendritikus sejt leukémia / limfóma lett. A pDS-eredetű rákos elváltozások a becslések szerint <1%-át teszik ki az akut limfómás eseteknek.

A klinikai gyakorlatban a betegség ritka előfordulása, illetve atipikus jellemzői miatt a pDS-L diagnózisa gyakran későn születik meg. Elviekben a pDS-L diagnózisa a 1) klinikai tüneteken; 2) a morfológiai elváltozásokon; 3) az áramlási citometriával meghatározott immunfenotípus profilon 4) és a citogenetikai, valamint molekuláris adatokon alapszik. Tekintettel az immunfenotípus profil jelentős átfedéseire más hematopoetikus neoplazmákkal (például T sejt limfóma vagy akut T sejt leukémia), a végleges diagnózis felállításához kiterjedt immunfenotípus analízisre van szükség. A pDS-L tipikus fenotípusos profilját korábban az alábbiak szerint írták le: CD4⁺CD56⁺ lin⁻ CD45RA⁺/RO⁻ CD11c⁻ CD116^{-/+low} CD123⁺ CD34⁻ CD36⁺ HLA-DR⁺. Citogenetikai és FISH analízissel kimutatták, hogy a pDS-L

sejtek kétharmada mutat citogenetikai eltéréseket a diagnózis megállapításakor, viszont nem lehet meghatározni egyetlen egy olyan genomi szintű, gén specifikus módosulást sem, mely speciálisan ezen betegségre jellemző lenne.

A pDS-L-ben szenvedő betegek életkora átlagosan 60 és 70 év közé tehető, ugyanakkor bármelyik korosztály esetében előfordulhat, mivel gyermekek esetében is beszámolták már ezen betegségről. A férfiak és nők közötti előfordulási arány 3:1, viszont a különbséget okozó tényezők jelenleg még nem ismeretesek. A pDS-L tipikus klinikai tünete bőrléziókban nyilvánul meg, amik a legtöbb esetben tünetmentes, szoliter vagy többszörös csomók, plakkok vagy zúzódás-szerű léziók formájában jelennek meg, melyek átmérője néhány millimétertől akár 10 centiméterig is terjedhet. Habár a pDS-L betegek egy kisebb részénél nem láthatóak bőrléziók a diagnóziskor, mégis a betegség lefolyása során ezek hamar kialakulnak. A pDS-L progressziója során a betegeknél fulmináns leukémia alakul ki, különösen a betegség terminális szakaszában. A pDS-L klinikai lefolyása igen agresszív, átlagban 12-14 hónapos túlélési időszakkal, mely gyakorlatilag független a betegség kezdeti megjelenési formájától. Annak ellenére, hogy a betegek jól reagálnak a kezdeti kemoterápiás kezelésre, a betegség gyakran kiújul és általában a beteg rezisztenssé válik a korábban alkalmazott kemoterápiás szerekre. Az egyetlen kezelési forma, mely tartós javulást eredményez, a magas dózisú kemoterápiát követő allogén őssejt transzplantáció rokontól vagy idegen donortól származó sejtek felhasználásával.

A pDS-L betegek csontvelőjéből vagy perifériás vérmintáiból izolált sejtek hozzásegíthetnének a pDS-ek funkcióinak jobb megismeréséhez. Egy korábbi tanulmányban munkacsoportunk átfogóan jellemezte egy 71 éves férfi betegből származó pDS-L sejtek fenotípusát. Ezen tanulmányban a CD4⁺CD56⁺ lin⁻ pDS-L sejtek jellemzően pozitívnak bizonyultak a CD36, CD38, CD40, CD45, CD45RA, CD68, CD123, CD184, HLA-DR, BDCA2 markerekre és granzim-B-re. A bőrléziókból és nyirokcsomókból származó malignus sejtek alapvető immunfenotípezálása, valamint a betegség klinikai jellemzői járultak hozzá a diagnózis felállításához. Míg FISH módszerrel történő genotípezálás a 13-as kromoszóma delécióját, illetve a 9-es kromoszóma monoszómiáját mutatta ki. A fentebb említett beteg fagyasztva tárolt csontvelő mintái járultak hozzá a malignus pDS-ek funkcionális jellemzőinek tanulmányozásához.

A pDS-L betegekből származó malignus sejtekből több munkacsoport is megpróbálkozott már sejtvonal létrehozásával. Jelenleg két sejtvonal és származékaik állnak rendelkezésre: CAL-1 és GEN2.2. GM-CSF és IL-3 jelenlétében történő rövid idejű *in vitro* tenyésztés alatt a CAL-1 sejtek érett DS morfológiát mutatnak, hosszú nyúlványokat növesztenek, TNF- α citokint termelnek, viszont IFN- α termelési képességüket elvesztik. Így ezen sejtvonal kevésbé tűnik alkalmasnak a normál pDS-ek modellezésére. A CAL-1 sejtekkel szemben a GEN2.2 sejtek viszont kiválóan képesek modellezni a primer pDS-eket, mivel vírussal történő stimulációt követően nagymértékű I-es típusú IFN termelésére képesek. Ugyanakkor ezen sejtvonal hosszabb idejű kultivációjához MS-5 dajka sejtek jelenlétét igényli.

1.4. Kísérletes módszerek a pDS-ek kevert sejt kultúrákban történő vizsgálatához

A pDS-ek ritka előfordulása, alacsony sejtszáma gyakran korlátozó tényező a kutatók számára, valamint a specifikus, sejt felszíni pDS markerek hiánya tovább nehezíti ezen sejtek tanulmányozását. Ezen két tényező eredményeképpen korábbi tanulmányokban olyan sejtseparálási módszerekkel találkozhatunk a pDS-ek esetében, ahol a sejtvonal pozitív sejtek mágneses izolálással történő deplécióját követően, áramlási citométer segítségével választják el a pDS-eket. Egyik lehetséges sejt felszíni antigén, mely alapján izolálhatóak a pDS-ek, az IL-3 receptor α lánc (CD123), ugyanakkor ezen antigén nem biztosítja a kellő specificitást egyes kevert limfocita populációkból, főként nyirokcsomókból vagy tonsillákból történő izoláláskor. A későbbiekben két potenciális pDS specifikus sejt felszíni antigént írtak le, a vér dendritikus sejt antigén (BDCA) 2-t és 4-et, más néven CD303-at és CD304-et (neuropilin-1-ként is ismert). Ugyanakkor a pDS-ek limitáló sejtszáma (1×10^6 pDS/donor) továbbra is nehézséget jelent. Szintén limitáló tényező a pDS-ek csökkent életképessége *in vitro* körülmények között, mely IL-3 citokin használatával mérsékelhető, ami viszont a sejtek fenotípusos érését idézi elő.

Ezen limitáló tényezők elkerülése érdekében több tanulmányban is kevert populációkban tartják fenn a pDS-eket, így a pDS-ek fenotípusos és funkcionális jellemzése PBMC vagy perifériás vér limfocita kultúrákban történik áramlási citométer segítségével. Irodalmi adatok alapján ismert *ex vivo* aktivált DS altípusok teljes vérből történő karakterizálása 6 színű áramlási citometriás analízis alapján. Ezen módszert optimalizálták a legmegbízhatóbb pDS azonosításhoz, ugyanakkor a bonyolult festési panel túlmutat a klinikai diagnosztikában használatos áramlási citometria határain. A BDCA ellenes antitestek

bevezetése a pDS-ek azonosítására egy vagy két fluoreszcens csatorna felhasználásával lehetővé tenné nagyszámú klinikai minták gyors analizisét, egy egyszerű festési eljárással. Így vizsgálataink célja, hogy a pDS-ek azonosítása perifériás vérmintákban a BDCA-4, potenciális pDS marker segítségével elérhetővé váljon.

2. Célkitűzések

- Célunk, hogy optimalizáljuk a pDS-ek áramlási citometriával történő azonosítását egészséges véradók perifériás vér mintáiban, kizárólag a pDS-ek BDCA 4 pozitivitását alapul véve.
- Szeretnénk megállapítani, hogy a leukémiás és normál pDS-ek funkcionális aktivitásában milyen különbségek lehettek fel.
- Célunk, hogy megvizsgáljuk, hogy a leukémiás pDS-ek alkalmasak lehetnek-e a pDS-ek RLH-mediálta vírus felismerésének tanulmányozására.
- Vizsgáljuk továbbá a pDS-ek TLR aktivációjának lehetséges hatását az RLH-k expresziójára és funkcionális sajátosságaira, illetve tanulmányozzuk a TLR-ek és RLH-k feltételezhető együttműködését a pDS-ek vírus ellen immunválaszában.

3. Anyagok és módszerek

3.1. A pDS-ek azonosítása áramlási citometriával

A pDS-ek egyszínű azonosításához, illetve fenotípusos analíziséhez felnőtt, egészséges véradók perifériás vérmintáit használtuk. Az előzőleg informált donorok beleegyezésével, a Belgyógyászati Klinika szakképzett munkatársai K-EDTA antikoagulánst tartalmazó BD Vacutainer™ csövekbe vették le a donorok vérének a Debreceni Egyetem Intézményi Etikai Bizottságának hozzájárulásával (engedély szám: RKEB/IKEB 2741-2008). Minden minta feldolgozása a levételt követő egy órában megtörtént. A műanyag csövekbe (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) szétosztott vérmintákhoz hozzáadtuk az ellenanyagokat (korábban optimalizált koncentrációban) az alábbiakban leírtak szerint. Jégen történő 30 perces inkubációt követően, fixáló paraformaldehidet tartalmazó 1X FACS lízis oldattal (BD Biosciences) lizáltuk a vörösvérsejteket. Majd centrifugálást követően 0,5 % borjú szérum albumint és 0,05 % nátrium-azidot tartalmazó PBS-sel mostuk a sejteket. A mintákat FL4 csatornával is rendelkező FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) analizáltuk.

A kísérletek során a következő ellenanyagokat használtuk:

- A pDS-ek két színnel történő azonosításához: Anti-HLA-DR (MHC II antigén prezentáló molekula)-FITC (klón: G46-6) és anti-CD123 (IL3-receptor)-PECy5 (klón: 9F5) monoklonális antitesteket (mindkettő a BD Biosciences-től) alkalmaztunk.
- Anti-BDCA-4 (neuropilin-1)-APC (klón: AD5-17F6, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) monoklonális antitestet használtunk a pDS-ek egy színnel történő azonosításához.
- CD4-FITC (klón: RPA-T4) és CD123-PE (klón 9F5, mindkettő a BD Biosciences-től) antitestek segítségével támasztottuk alá a pDS-ek egyszínű azonosításánál kapott eredményeket.
- A kompenzációhoz egy színnel jelölt sejteket használtunk, melyek anti-CD3-FITC (klón: UCHT1, BD Biosciences), anti-CD3-PE (klón: UCHT1, BeckmanCoulter, Hialeah, FL) vagy anti-CD123-PECy5 (BD Biosciences) antitestekkel voltak jelölve.

Az átfedő emissziós spektrumok miatt szükséges hardware-szintű kompenzációt ugyanazon mintából származó, egy színnel jelölt sejtekekkel végeztük, míg a szoftveres kompenzációt az FL1, FL2 és FL3 fluoreszcens csatornák esetében FlowJo szoftver (TreeStar,

Ashland, OR, USA) segítségével kiviteleztek. Az FL1 és FL2 csatorna fluoreszcencia értékeit fluoreszcensen jelölt gyöngyökkel is kompenzáltuk (CaliBrite beads, BD Biosciences). Egy minta mérése során $5-8 \times 10^5$ eseményt rögzítettünk 300 szekundum alatt, melyből 500–1300 sejt volt pDS. Az adatok kiértékelése FlowJo szoftverrel (TreeStar) történt.

3.2. A pDS-ek teljes vérből történő fenotípusos analízise TLR ligand aktiválást követően

A pDS-ek aktiválásához a perifériás vérmintákat TLR7 liganddal, imiquimoddal (R837; Invivogen, San Diego, CA) kezeltük meg. Aktiválást követően a mintákat 37°C-on, 5 % CO₂ tartalmú termosztátban 24 órán keresztül inkubáltuk. A pDS-ek fenotípusos vizsgálatához a sejteket a korábban leírtak szerint, a nem aktivált sejtekhez hasonlóan megfestettük a következő fluoreszcensen konjugált antitestekkel:

- Az imiquimoddal aktivált pDS-ek fenotípusos analíziséhez anti-HLA-DQ (MHC II antigén prezentáló molekula)-PE (klón: HLADQ1) és anti-CD62L (L-szelektin adhéziós molekula)-PE (clone Dreg56) antitesteket használtunk (mindkettő a BD Biosciences-től).
- A pDS-ek egy színnel történő azonosítása és fenotípusos jellemzése anti-HLA-DQ-FITC (klón: Tü169) és anti-CD62L-PE antitestekkel történt (mindkettő a BD Biosciences-től).

Az áramlási citometriás adatok gyűjtése, a kompenzáció és a minták analízise a pDS-ek azonosításánál leírtak szerint végeztük. A fenotípusos analízis >93%-os tisztaságú pDS populáción történt. A pDS populációk fluoreszcencia intenzitását medián értékek alapján határoztuk meg.

3.3. Primer és leukémiás pDS-ek izolálása, illetve sejt kultúráik fenntartása

A kísérletekhez használt, humán eredetű vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat debreceni Regionális Vérellátó Központjának közreműködésével kaptuk. A human vérkészítményekkel történő munkát az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatója, valamint a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte. Minden vérvétel a donorok előzetes, írásos beleegyezésével történt és a donorok adatainak feldolgozása valamint megőrzése az Orvos Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve valósult meg. A vérkészítményekből a PBMC-t Ficoll-Paque oldattal (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) történő sűrűség-alapú gradiens centrifugálással nyertük ki. A primer pDS-eket PBMC-ből

izoláltuk, negatív szelekción alapuló, mágneses sejtszeparáló kit és QuadroMACS mágnes (mindkettő a Miltenyi Biotec-től) segítségével. A pDS sejtpopulációk tisztasága minden esetben 91 – 96% közöttinek adódott, áramlási citometriás mérések alapján. A frissen izolált sejteket RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) médiumban szétosztottuk. A tápfolyadékot L-glutaminnal, Na-piruváttal (mindkettő a Sigma Aldrich-től), penicillinnel, streptomycinnel, 10% végkoncentrációjú hőinaktivált magzati borjú savóval (mind az Invitrogen-től) és rekombináns IL-3 citokinnel (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) egészítettük ki, mely citokin nélkülözhetetlen a primer pDS-ek túléléséhez *in vitro* körülmények között.

A leukémiás pDS-eket egy pDS leukémiában szenvedő, 71 éves beteg csontvelő mintáiból izoláltuk, az országos Gyógyintézeti Központ, Haematológiai és Immunológiai Intézet (Budapest, Magyarország) etikai bizottságának jóváhagyásával. A pDS-ek izolálásához a csontvelői sejteket anti-CD123-PECy5 (klón: 9F5, BD Biosciences) antitesttel jelöltük meg, majd 30 perces szobahőmérsékleten történő inkubációt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-sel (PAA Laboratories, Pasching, Austria). A pDS-L sejtek FACSDiVa sejtszorter (BD Biosciences) segítségével nyertük ki a mintákból, a sejtek CD123 pozitivitását és fényszórási paramétereit alapul véve. Az így izolált sejtek tisztaságát és életképességét 7-amino-actinomycin D (Sigma-Aldrich) festéssel ellenőriztük FACSCalibur citométeren. Szortolást megelőzően átlagosan a sejtek 61,5±3%-a (n=3) volt pDS-L sejt a csontvelői mintákban. Szortolás után a sejtek több, mint 95%-a mutatta a leukémiás pDS-ekre jellemző fenotípust és életképességük 87% - 93% között mozgott. A frissen izolált sejteket 48 lyukú tenyésztőlemezen (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) 1×10^6 sejt/ml koncentrációban IL-3 citokin nélküli RPMI 1640 (Sigma Aldrich) médiumban szétosztottuk.

3.4. A leukémiás pDS-ek funkcionális jellemzése

A pDS-L sejtek TLR aktiváció indukálta fenotípusos változásának vizsgálatához az RPMI-1640 médiumban lévő sejteket imiquimoddal (InvivoGen), A típusú CpG-vel (CpG 2216), B-típusú CpG-vel (CpG 2006) (mindkettő a Hycult Biotechnology-től származik), vagy imiquimod és B-típusú CpG kombinációjával kezeltük meg. A TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejtek fenotípusos analízisét anti-HLA-DQ-PE (Klón: HLADQ1) és anti-CD86/B7-2-PE (Klón: IT2.2) antitestek (mindkettő a BD Biosciences-től) felhasználásával hajtottuk végre. Az ellenanyagokkal történő 30 perces inkubációt követően a sejteket 1 ml 0.5% borjú szérum

albumint és 0,05% Na-azidot tartalmazó PBS-sel mostuk, majd a mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel elemeztük. A kompenzáció és az adatok kiértékelése a korábban leírtak szerint történt.

A 24 és 48 órás aktivációkat követően a sejt kultúrák felülúszóit eltávolítottuk és további felhasználásig -80°C -on tároltuk. A felülúszókból a sejtek által termelt citokinek koncentrációját ELISA-val, illetve citometriás esszével határoztuk meg. Az IFN- α koncentrációt a PBL Biomedical által forgalmazott ELISA kittel (Piscataway, NJ, USA) mértük. Az IL-6 és TNF- α mennyiségét FlowCytomix Flex Set kittel (Bender MedSystems / eBioscience, Bécs, Ausztria) mértük, FACSArray bioanalizátor (BD Biosciences) segítségével.

A leukémiás pDS-ek T sejt aktiváló kapacitásának meghatározásához TLR ligandokkal aktivált leukémiás pDS-eket ko-kultiváltunk heterológ CD3⁺ T sejtekkel majd a T sejt aktivációt ELISPOT módszerrel detektáltuk. Első lépésként 96-well polivinilidén difluoriddal (PVDF) fedett 96 lyukú ELISPOT lemezeket (Millipore, Billerica, MA, USA) inkubáltunk anti-IFN- γ antitesttel (NatuTec, Frankfurt, Germany) 4°C -on egy éjszakán keresztül. Mosási lépést követően a lemezeket teljes RPMI-1640 médiummal blokkoltuk 1 órán át, szobahőmérsékleten. Az esszéhez használt T sejteket egészséges donorok PBMC-jéből izoláltuk anti-CD3 mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotec). A T sejteket (10^6 sejt/lyuk) aktivált pDS-L sejtekkel (10^4 - 10^5 sejt/lyuk) ko-kultiváltuk 4 napon keresztül RPMI-1640 médiumban. Pozitív kontrollként fitohemagglutininnal és konkanavalin A-val (mindkettő a Sigma-Aldrich-től) aktivált T sejteket használtunk, míg a kezeletlen T sejtek és az IL-3-mal kezelt pDS-L sejtek T sejtekkel közös sejt kultúrában képezték a negatív kontrollt. Ezen ko-kultúrákat az előzőleg blokkolt ELISPOT lemezekre osztottuk szét 2×10^5 sejt/lyuk sejt-sűrűséggel, majd 24 óra elteltével a sejteket eltávolítottuk a lemezről és mosási lépést követően biotin-konjugált detektor antitesttel (BioLegend) inkubáltuk a lemezeket 2 órán keresztül. Ezt követően avidinnel konjugált torma-peroxidázt, illetve az enzim szubsztrátját (AEC, 3-amino-9-ethylcarbazol; NatuTec) vittük fel a lemezekre. Az enzimreakció leállításához a lemezeket háromszor mostuk desztillált vízzel. A lemezek száradását követően a megjelenő spotokat ImmunoScan analízátorral (CTL Ltd., Shaker Heights, OH, USA) detektáltuk.

3.5. A RIG-I citoplazmatikus nukleinsav receptor vizsgálata

A RIG-I expresszió meghatározásához, frissen izolált, primer pDS-eket és pDS-L sejteket kezeltünk meg imiquimoddal (InvivoGen), A típusú CpG-vel (CpG 2216) vagy B típusú CpG-vel (CpG 2006) (mindkettő a Hycult Biotechnology-tól) 8 órán keresztül a Q-PCR analízis, illetve 24 órán át a western blot és ELISA mérésekhez. Külön kísérletsorozatban a sejteket 24 óráig aktiváltuk imiquimoddal és CpG A-vel, majd a felülülő eltávolítását követően a sejteket kétszer mostuk friss médiummal. Ezt követően a sejteket 5'ppp-dsRNS-sel kezeltük meg LyoVec transzfekciós rendszert (InvivoGen) alkalmazva. A LyoVec+5'ppp-dsRNS komplex 1 µg/mL koncentrációban tartalmazta a RIG-I ligandot, a forgalmazó által javasoltak alapján. A sejtek felülülőjéből 16 órás inkubációt követően meghatároztuk az IL-6 citokin koncentrációját, míg 24 órás felülülőkből az IFN- α mennyiségét mértük meg ELISA módszer segítségével. A kontroll kísérletek esetében LyoVec-et és LyoVec+kontroll oligo komplexeket adtunk a sejtekhez, a gyártó által javasolt protokoll alapján.

A relatív génexpressziós változások detektálását Q-PCR módszerrel végeztük. TRIzol reagens (Invitrogen) segítségével a sejtekből RNS-t izoláltunk, majd 1.5-2 µg RNS felhasználásával, SuperScript II RNáz H reverz transzkriptáz (Invitrogen) és Oligo(dT)15 primerek (Promega, Madison, WI, USA) jelenlétében elvégeztük a reverz transzkripciót. A Q-PCR-t gén specifikus TaqMan esszével (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) végeztük, az alábbi primereket használva: RIG-I: Hs00184937_m1, IRF-7: Hs00185375_m1, IFNA-1: Hs00855471_g1, IFNA-2: Hs00999940_s1. Minden Q-PCR reakciót három párhuzamos mintában mértünk le, AmpliTaq DNS polimerázt és ABI Prism 7900HT real-time PCR készüléket (Applied Biosystems) alkalmazva. A minták normalizálása 36B4 háztartási géne történt. Az adatok kiértékeléséhez SDS 2.1 szoftvert (Applied Biosystems) használtunk.

A sejtek által termelt citokinek koncentrációját a sejtek felülülőjéből ELISA módszerrel határoztuk meg. Az IFN- α detektálásához PBL InterferonSource ELISA kitet, míg az IL-6 citokin méréséhez OptEIA™ ELISA kitet (BD Biosciences) használtunk.

A RIG-I expresszió protein szinten történő vizsgálatához a sejteket lízis/loading pufferben lizáltuk. A fehérjék 100 °C-on történő 5 perces denaturálását követően a mintákat 10%-os SDS-PAGE gélen megfuttattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. A nem specifikus kötődések elkerülése érdekében a membránt 5%-os száraz, nem zsíros tejport tartalmazó TBS-Tween oldatban 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően

a membránt anti-RIG-I, anti-STAT1, anti-foszfo-STAT1 (Ser727), anti-foszfo-STAT1 (Tyr701) (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) és anti- β -aktin antitestekkel (Sigma-Aldrich) reagáltattuk 1:1000-szeres hígításban. Három mosási lépést követően tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl másodlagos ellenanyaggal (1:5000-szeres hígítás) inkubáltuk a membránt 30 percig szobahőmérsékleten. Mosást követően a fehérlőanyagot kemilumineszcens módszerrel tettük láthatóvá (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific). A kapott jel erősségének kvantitatív mérése Kodak Image Station 2000mm kamera (Rochester, NY, USA) segítségével történt.

A sejtek IFNAR1 receptorának gátlásához a sejteket 1 órán át előinkubáltuk anti-IFNAR1 monoklonális antitesttel (Abcam, Cambridge, UK), melyet a rekombináns human IFN- α -val (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) vagy TLR7/9 liganddal. történő 3 óras aktiválás követett. A RIG-I kifejeződésének változását Q-PCR módszerrel detektáltuk.

3.6. Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai analízisére Student-féle t-próbát, valamint variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk Bonferroni post-hoc teszttel. A statisztikai számítások elvégzéséhez a GraphPad PRISM szoftver 5.04-es verzióját használtunk. A választott szignifikancia szint: $p < 0,05$.

4. Eredmények

4.1. Plazmacitoid DS-ek azonosítása teljes vérből egyszínű áramlási citometriával

Ahhoz, hogy standardizáljuk a pDS-ek azonosításhoz szükséges módszert, a perifériás vérmintákat anti-HLA-DR-FITC és anti-CD123-PECy5 antitestekkel jelöltük meg, majd kétszínű áramlási citometriával elemeztük a mintákat. Az adatok elemzésénél a kapukat úgy helyeztük el, hogy a maradék vörösvérsejteket és a sejtörmelégeket kizárjuk és a HLA-DR-FITC és CD123-PECy5 pozitív sejtek képezzék a pDS populációt. A pDS kapun belüli sejtek homogenitását fényszórási paraméterekre történő visszakupuzással ellenőriztük. A vizsgált, egy csatornával történő azonosítási módszerhez a vérmintákat BDCA-4-APC, CD4-FITC, valamint CD123-PE antitestekkel jelöltük meg és a kaput először a BDCA-4-APC pozitív pDS sejtekre tettük, majd ezen sejtpopulációt tovább vizsgáltuk CD4-FITC és CD123-PE pozitivitás alapján, mivel ezen fenotípus specifikusan jellemző a pDS-ekre egészséges véradók perifériás vérében. Eredményeink azt mutatják, hogy a BDCA-4 antigén önmagában is alkalmas lehet a pDS-ek perifériás vérmintákban történő azonosításához, ha az azonosítást a fényszórási paraméterekkel is alátámasztjuk.

A fenti, pDS-ek BDCA-4 pozitivitásán alapuló azonosítási módszer hasznos eszköz lehet a diagnosztikában, ahol a sejtfelszíni festések antitest panelét célszerű a lehető legegyszerűbbnek megválasztani. Azonban a sejtfelszíni antigének expressziója megváltozhat a sejtek izolálása során vagy, rövidtávú *in vitro* tenyésztés során, mely a ritka sejtípusok kevert sejtpopulációkban történő vizsgálatához szükséges. A egyes sejt kultúrákat (főként PBMC-t) a pDS-ek tanulmányozására széles körben használják, így célunk az volt, hogy erre a célra megfelelő egyszínű, BDCA-4 pozitivitáson alapuló azonosítási eljárást hozzunk létre. Ezen célból kifolyólag 5 egészséges, fiatal felnőtt donor vérmintáiban elemeztük a pDS-ek fenotípusos változásait 9,06 μM (2,5 $\mu\text{g/mL}$) TLR7 liganddal (imiquimod) történő kezelést követően. A pDS-ek számát, valamint a CD62L és HLA-DQ molekula expressziós változásait egyszínű, illetve kétszínű azonosítási módszerrel is vizsgáltuk, 24 órával az aktivációt követően. TLR7 liganddal történő kezelés során az MHC II molekulák (HLA-DR and DQ) expressziós szintje növekedett, míg a CD62L adhéziós molekula kifejeződése csökkent. Az imiquimoddal kezelt teljes vérmintákban mind a kétszínű, mind pedig vizsgált, egyszínű áramlási citometriás módszer alkalmasnak bizonyult a HLA-DQ és a CD62L pDS-eken

bekövetkező expressziós változásainak követésére. Két színnel történő azonosítás esetén alacsonyabb volt az átlagos fluoreszcencia értékek aránya (kezeletlen vs. kezelt sejtek) a CD62L expressziónál, illetve ezen értékek magasabbak voltak HLA-DQ esetében. Az egyszínű azonosítási módszernél mind a CD62L és mind a HLA-DQ expresszió (variációs együttható: 14 és 7% vs. 36 és 14%) esetében alacsonyabb volt a variabilitás. fontos megjegyezni, hogy a pDS-ek BDCA-4 expressziója állandó szinten maradt TLR7 ligand kezelést és 24 órák *in vitro* kultivációt követően is, így ezen tényező nem veszélyezteti az egyszínű azonosítási módszer megbízhatóságát.

A módszer reprodukálhatóságának vizsgálatára ugyanazon donortól vettünk friss vérmintákat a 0., 4., és 8. napon is, majd a vérvételtől számított 60 percen belül a sejteket megkezeltük imiquimoddal (2.5 µg/mL). Ezt követően a pDS-eken kifejeződő HLA-DQ és CD62L aktivációs markerek expresszióját mindkét módszer segítségével megvizsgáltuk, 24 órás inkubációs idő elteltével. Mérési eredményeink szerint mind a kétszínű, mind az egyszínű azonosítási módszer jól reprodukálható. Kétszínű azonosításnál az átlag fluoreszcencia intenzitás aránya (kezeletlen vs. kezelt sejtek) 0,79 (tartomány: 0,74–0,84; standard deviáció/S.D./, 0,05) volt a CD62L esetében, míg 0,77 (tartomány: 0,67–0,83; S.D., 0,09), ha az azonosítást egyszínű módszerrel végeztük. Kétszínű módszerrel magasabb emelkedést tapasztaltunk a HLA-DQ expressziójában; a medián fluoreszcencia intenzitás értékek átlaga 2,21 (tartomány, 2,16–2,26; S.D., 0,05) volt, míg egyszínű módszer esetében ez az érték 1,56-nak (tartomány, 1,52–1,59; S.D., 0,04) adódott. A variációs együttható egyszínű azonosításnál 11% és 2% volt a CD62L és HLA-DQ fehérjéknél, míg két színnel történő azonosítási módszer esetében ezen együttható 6%, illetve 2% volt.

4.2. A TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejtek fenotípusos jellemzése

A pDS-L sejtek TLR ligandokkal történő aktiválhatóságuk meghatározásához egy pDS-L beteg fagyasztva tárolt csontvelő mintáiból izoláltunk sejteket CD123 pozitivitás alapján. A pDS-L sejtek százalékos arányát (61,5±3%) CD123 pozitivitás és fényoszórási paraméterek alapján határoztuk meg, három független kísérlet alapján. Szortolást követően a sejtek 95%-a mutatott pDS fenotípust és a sejtek életképessége 87% és 93% között mozgott, 7-amino-aktinomycin D életképesség festés alapján.

A pDS-L sejtek aktivációját a sejteken kifejeződő CD86 és HLA-DQ molekulák expressziójának vizsgálatával határoztuk meg, 24 és 48 órás TLR7 liganddal (imiquimod) és TLR9 liganddal (CpG-A vagy CpG-B) történő kezelések után. Az imiquimod bizonyult a leghatékonyabb CD86 kifejeződést indukáló aktivátornak, a CpG-B-nek kisebb, de még jól detektálható hatása volt, viszont a CpG-A kezelés csak kismértékű növekedést eredményezett a CD86 kifejeződésében. Az imiquimodot és a CpG-B-t együtt alkalmazva hasonló CD86 expressziós változásokat tapasztaltunk, mint mikor a sejteket csak imiquimoddal kezeltük. A fenotípusos változások 48 óránál sokkal kifejezettebbek voltak, mint 24 óránál. A CD86 molekulával szemben, a HLA-DQ fehérje esetében az imiquimoddal és CpG-B-vel történő kombinált kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak, mely arra utal, hogy a pDS-L sejtek TLR7-en és TLR9-en keresztül történő egyidejű aktivációja szinergista hatást eredményez a HLA-DQ molekula kifejeződése esetében. Megfigyelésünk arra utal, hogy ezen funkcionálisan igen jelentős sejtfelszíni molekulák expressziójának szabályozása független egymástól. Eredményeink továbbá arra is rávilágítanak, hogy a TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejtek hasonló fenotípusos változásokat mutatnak, mint a normál pDS-ek.

4.3. A TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejtek citokin szekréciójának vizsgálata

A TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejtek citokin profiljának meghatározásához vizsgáltuk a TNF- α , IL-6 és IFN- α citokinek koncentrációját a sejtek felülűszójában 24 és 48 órás TLR7 és TLR9 ligandokkal történő kezeléseket követően áramlási citometriás vagy ELISA módszerrel. A TLR7 liganddal (imiquimod) és TLR9 liganddal (CpG-B) kezelt pDS-L sejtek felülűszójában emelkedett TNF- α szintet detektáltunk, ami CpG-A kezelést követően nem volt megfigyelhető. Az imiquimod és a CpG-B együttes alkalmazása alacsonyabb TNF- α szekréciót eredményezett, mint külön-külön használva a ligandokat. Hasonló eredményeket kaptunk az IL-6 citokin esetében is, ugyanakkor az IL-6 mennyisége azonos, vagy magasabb volt a 48 órás felülűszókban, mint a 24 órákban, mely a TNF- α és IL-6 citokinek különböző szekréciós kinetikájára enged következtetni. Bár az IFN- α szekréció a legjellemzőbb velejárója a pDS aktiválásnak, a leukémiás sejtek felülűszójából nem tudtuk mérni ezen citokint. Kontroll kísérletekben az imiquimoddal és CpG-A-val kezelt normál pDS-ek nagy mennyiségű IFN- α -t termeltek, mely bizonyította, hogy az általunk használt TLR ligandok képesek IFN- α indukcióra.

4.4. Az aktivált pDS-L sejtek T sejt aktiváló képessége

Mivel a leukémiás pDS-ek hasonló fenotípusos változásokat mutattak, mint a normál pDS-ek, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a pDS-L sejtek T sejt aktiváló képességét is. Így TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejteket ko-kultiváltunk allogén naív T sejtekkel, majd ELISPOT módszer segítségével detektáltuk az IFN- γ -termelő T sejtek számát a sejtkulturákban. A CpG-A-vel és CpG-B-vel kezelt pDS-L sejtek magas allostimulatórikus aktivitással rendelkeztek, míg az imiquimoddal aktivált sejtek esetében ugyan szignifikáns, de jóval gyengébb T sejt aktiváló képesség volt megfigyelhető. Érdekeséggéppen elmondható, hogy a pDS-ek TLR7 liganddal (imiquimod) és TLR9 ligandokkal (CpG-A és CpG-B) együttesen történő előkezelését követően szignifikánsan alacsonyabb számban tudtuk detektálni az IFN- γ -termelő T sejteket a sejtkulturákban, mely összhangban van korábbi megfigyeléseinkkel. Ezen eredmények azt igazolják, hogy TLR9 által mediált aktivációval nagymértékben fokozni lehet a pDS-L sejtek allostimulatórikus képességét, míg TLR7 receptoron keresztül ezen hatás ugyan kisebb mértékben valósul meg, de mindkét folyamat a Th1 típusú polarizációt segíti elő. Ezek a hatások a TLR aktiváció következtében megemelkedett pro-inflammatórikus citokin szekréciónak, valamint a kostimulatórikus és antigén prezentáló molekulák fokozott kifejeződése révén valósul meg. Eredményeink alapján elmondható, hogy a pDS-ek TLR7 és TLR9 aktivációja nem kollaboratív, hanem gátló hatással van egymásra.

4.5. I-es típusú IFN választól független, TLR ligandok által indukált RIG-I expressziós változások pDS-ekben

Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a nyugvó humán, illetve egér pDS-ekben egyaránt igen alacsony szinten expresszálódik a RIG-I receptor, illetve virális stimulust követően sem aktiválódik ezen receptor. Ugyanakkor egyik tanulmány sem vizsgálta a TLR aktivációt követő RIG-I expressziós változásokat. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a TLR ligand aktiváció hatását a RIG-I expressziós szintjére, perifériás vérből izoláltunk primer, humán pDS-eket. A sejteket ezután növekvő koncentrációjú (0,25 – 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) TLR7 liganddal (imiquimod) és szintén növekvő koncentrációjú (0,5 - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) TLR9 liganddal (CpG-A vagy CpG-B) kezeltük. A korábbi tanulmányokkal összhangban a kezeletlen primer pDS-ek esetében sem RNS, sem fehérje formájában nem észleltünk RIG-I expressziót.

Ugyanakkor mind a CpG-A és mind az imiquimod aktiválás koncentráció-függő módon fokozta a sejtek RIG-I expresszióját, míg a CpG-B kezelés nem indukálta a RIG-I kifejeződést a sejtekben. A 2,5 µg/mL imiquimoddal vagy 5 µg/mL CpG-A-val történő kinetikai mérések alapján elmondható, hogy az mRNS szintű RIG-I expresszió már 2 órával az aktivációt követően megjelenik, és a TLR ligand kezelést követő 6. órában éri el a maximumot. Mint ahogyan korábban megfigyeltük a primer és leukémiás pDS-ek citokin szekréciója esetében is, a CpG-A és imiquimod együttes alkalmazása kisebb mértékű RIG-I expressziót eredményezett, mint külön-külön használva a ligandokat.

A kapott eredményeink arra ösztönöztek minket, hogy megvizsgáljuk, hogy milyen funkcionális változásokat okozhat a sejtekben a TLR stimulációt követő RIG-I expressziós szint emelkedés. Ehhez perifériás vérből származó primer pDS-eket kezeltünk meg 5 µg/mL CpG-A-val vagy 2,5 µg/mL imiquimoddal, majd 24 órás aktiválást követően a sejtek felülszóját eltávolítottuk és friss médiumban 1 µg/mL 5'ppp-dsRNS-sel, a RIG-I receptor specifikus ligandjával újraaktiváltuk. A vártak megfelelően, a frissen izolált primer pDS-ek, illetve a kezeletlen sejtek az alacsony RIG-I expressziójuk miatt TLR aktiváció nélkül, 5'ppp-dsRNS-sel történő stimulációra nem válaszoltak IFN- α és IL-6 citokin szekrécióval. Ugyanakkor a CpG-A-val vagy imiquimoddal előkezelt, primer pDS-ek 5'ppp-dsRNS aktivációt követően IFN-t és IL-6 citokint szekretáltak, koncentráció-függő módon. Fontos kiemelni, hogy csak azon pDS-ek aktiválódtak 5'ppp-dsRNS jelenlétében, melyeket TLR7 vagy TLR9 liganddal előkezeltünk. Ezen eredmények azt mutatják, hogy endoszómális TLR aktivációt követően a pDS-ek képessé válnak citoszolikus virális RNS felismerésére RIG-I receptorokon keresztül.

Következő lépésben vizsgáltuk, hogy vajon a TLR7 és TLR9 által indukált RIG-I expresszió I-es típusú IFN-ek által mediált-e. Így a primer pDS-ek CpG-A-val (2,5 µg/mL) vagy imiquimoddal (5 µg/mL) történő aktivációját megelőzően, a sejteket IFN-alfa/béta receptor 1-et (IFNAR1) specifikusan felismerő és gátló antitestekkel kezeltük meg. A receptor gátlás hatékonyságát az Mx1 és OAS1 gének expressziójának vizsgálatával ellenőriztük, mivel ezen géneket az IFN indukció korai faktoraiként tartják számon. Az IFNAR1 receptor gátlása majdnem teljes mértékben felfüggeszti a Mx1 és OAS1 expresszió fokozódását az I-es típusú IFN-nal aktivált primer pDS-ekben. Ugyanakkor az IFNAR1 receptor gátlása nem befolyásolja a CpG-A-val, illetve imiquimoddal indukált RIG-I expresszió szintjét, mely arra enged

következtetni, hogy a TLR aktivációt követő RIG-I fokozódás az autokrin I-es típusú IFN választól független.

Ezen megfigyeléseink további igazolásaként kísérleteinket pDS-L sejteken is elvégeztük, melyekről korábban kimutattuk, hogy nem képesek I-es típusú IFN szekrécióra. Korábbi kontroll kísérleteinkben demonstráltuk, hogy míg a primer pDS-ek imiquimod vagy CpG-A aktiválást követően nagy mennyiségű IFN- α termelésre képesek, addig az általunk használt leukémiás pDS-ek erre nem képesek. Annak igazolására, hogy a TLR-közvetített jelátviteli útvonal molekuláris szinten funkcióképes a pDS-L sejtekben, TLR aktivációt követően vizsgáltuk az IFNA gének kifejeződését mRNS szinten. Kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az IFNA gének expressziója szignifikánsan növekedett 6 órás imiquimod vagy CpG-A kezelést követően, ugyanakkor a CpG-B-vel történő aktiváció nem indukálta sem az IFNA-1, sem az IFNA-2 gének kifejeződését.

Az IFN- α jelátviteli útvonal működésének további igazolásaként vizsgáltuk ezen útvonal legfőbb szabályozó faktorának, az IFN regulatórikus faktor 7-nek (IRF-7) az mRNS szintű expresszióját TLR ligand aktivációt követően. Eredményeink szerint az IRF-7 transzkripció faktor kifejeződési mintázata hasonló volt az IFNA-1 és IFNA-2 génekéhez; míg az imiquimod vagy CpG-A kezelés nagymértékben fokozta az IRF-7 expressziót, a CpG-B-vel történő kezelés inkább gátló hatást gyakorolt az IRF-7 expresszióra. Eredményeink összhangban vannak a leukémiás pDS-ek IFN- α termelését vizsgáló korábbi megfigyelésekkel, melyekben leírták, hogy a TLR indukált jelátviteli útvonal funkcióképes a pDS-L sejtekben is, viszont az I-es típusú IFN protein szintű szekréciója gátolt.

A TLR7-tel aktivált GEN2.2 sejtek (humán pDS-eredetű setvonal) esetében korábban már kimutatták, hogy több IFN-indukálta gén expressziója is független az I-es típusú IFN-ok jelenlététől, viszont függ a p38 mitogén-aktivált protein kináz (MAPK)-mediált STAT1 701-es pozíciójában lévő tirozin (Tyr701) foszforilációjától. Ezen kívül a STAT1 foszforilációja történhet a 727-es pozícióban lévő szerinen (Ser727) is, és az I-es típusú IFN-onokról ismert, hogy a STAT1 foszforilációját mind a szerin, illetve mind a tirozin származékok révén képes indukálni. A STAT1 lehetséges szerepét a TLR ligand aktiváció indukálta RIG-I expresszióhoz vezető korai jelátviteli folyamatokban, a STAT1 mindkét foszforilációs helyének vizsgálatával határoztuk meg. A pDS-ek 90 perces TLR7, illetve TLR9 ligandokkal történő stimulálása a STAT1 Tyr701-es foszforilációjához vezetett, míg a Ser 727 foszforilációja nem volt

megfigyelhető. Ezen megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a TLR indukálta RIG-I expresszió emelkedés humán pDS-ekben MAPK-függő, viszont IFNAR1-független STAT1 aktiváción keresztül valósul meg.

5. Diszkusszió

Számos kórképre jellemző a pDS-ek megváltozott száma a perifériás vérben, valamint migrációs és funkcionális sajátosságaik változása. SLE-ben szenvedő betegek esetén például megfigyelhető a pDS-ek veseléziókba történő vándorlása és ezáltal a pDS-ek számának és funkcionális aktivitásának csökkenése a perifériás vérben, mely gyakran a betegség tüneteinek súlyosbodásával jár együtt. Ezt figyelembe véve az SLE-s betegek pDS számának követése a perifériás vérben minimálisan invazív eljárást kínál a szöveti érintettség vizsgálatára a betegség különböző stádiumaiban. Korábbi tanulmányok kidolgoztak egy komplex, több sejtfelszíni markerrel (HLA-DR, CD123 és CD4) történő pDS azonosítási módszert perifériás vérminták esetében. Ugyanakkor ez a módszer nem optimális a rutin diagnosztikai alkalmazás számára, mivel a klinikai gyakorlatban általánosan használt citométerek 3-5 csatornás mérésekre alkalmasak, így a pDS-ek azonosításán kívül a fenotípusos jellemzésre már nem nyújtanak lehetőséget. A BDCA-2 és BDCA-4 antigének a perifériás vér sejtjei közül kizárólag csak a pDS-eken expresszálódnak, így a pDS-ek specifikus markereiként szolgálhatnak. Ugyanakkor a BDCA-2 fehérje kifejeződése a sejteken függ a sejtek aktivációs állapotától, így használata nem célszerű SLE esetében, ahol a pDS-ek állandóan aktivált állapotban vannak. Munkánk során megvizsgáltuk, hogy a BDCA-4 antigén megfelelő lenne-e a pDS-ek egy markerrel történő azonosítására humán perifériás vérből, és azt találtuk, hogy a pDS-ek BDCA-4 pozitivitása a sejtek fényszórási paramétereinek felhasználásával együtt alkalmas a pDS-ek azonosítására. A módszer alkalmasságának igazolására funkcionális elemzéseket is végeztünk, melyekben a HLA-DQ és CD62L molekulák expressziós változásait követtük nyomon pDS-eken imiquimod aktivációt követően. Hasonlóan a többszörös azonosítási módszerekhez, a BDCA-4 markerrel történő azonosítás során is képesek voltunk követni a pDS-ek fenotípusos változásait. Ugyanazon donorból származó vérminták ismételt analizálása megmutatta, hogy az általunk használt módszer jól reprodukálható. Eredményeink meggyőzően azt sugallják, hogy a BDCA-4 antigén expressziója nem csökken a pDS-eken TLR aktivációt követően, így ezen antigén megfelelő, független markere lehet a pDS azonosításnak nagyszámú vérminta esetén is, az *in vitro* diagnosztikai vizsgálatokban. Az általunk leírt új BDCA-4 alapú áramlási citometriás módszer elősegítheti ezen sejtek fenotípezését és funkcionális analizését friss vérminták

esetében, úgy, hogy a vizsgálat során csak egy fluoreszcens csatornát kell használni a pDS-ek azonosítására.

Továbbiakban azt feltételeztük, hogy a malignus pDS-ekkel jól lehetne modellezni a DS-eket és felhasználhatóak lehetnének a DS-ek biológia funkciójának tanulmányozásához. Így a korábban *Gopcsa és munkatársai* által diagnosztizált pDS leukémiában szenvedő beteg csontvelő mintáiból izoláltunk pDS-L sejteket, melyeken funkcionális elemzést hajtottunk végre. A TLR7-en és TLR9-en keresztül zajló jelátvitel IL-6 és TNF- α pro-inflammatórikus citokinek, valamint I-es típusú IFN termelését váltja ki pDS-ekben MyD88-függő útvonalon keresztül, melyben az IRAK-1 és IKK α által indukált IRF-7 foszforiláció is szerepet játszik. Munkánk során vizsgáltuk, hogy a pDS-L sejtek hasonló funkcionális tulajdonságokkal rendelkeznek-e, mint a normál pDS-ek, így TLR9 liganddal (CpG-A és CpG-B) és TLR7 liganddal (imiquomid) történő kezelést követően vizsgáltuk a pDS-L sejtek funkcionális válaszát. Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy hasonlóan a normál pDS-ekhez, az imiquimoddal és CpG-B-vel történő TLR7 és TLR9 aktiváció fokozta a sejtek kostimulatórikus (CD86) és antigén prezentáló (HLA-DQ) molekuláinak sejt felszíni expresszióját, valamint növelte a sejtek pro-inflammatórikus citokin (TNF- α és IL-6) szekrécióját, mely CpG-A esetében nem volt tapasztalható. A pDS-ek esetében kimutatták, hogy a TLR jelátviteli komplex visszatartásra kerül a korai endoszómában, mely az IRF7 kifejeződésének fokozódásával és I-es típusú IFN termelés indukációjával jár együtt. Ezen megfigyelésekkel összhangban kimutattuk, hogy ezen események a pDS-L sejtek esetében is lezajlanak, mivel a sejtek imiquimoddal vagy CpG-A-val történő kezelése fokozza az IRF-7, IFNA-1 és IFNA-2 gének mRNS szintű indukcióját, mely arra enged következtetni, hogy a jelátviteli útvonal ezen sejtekben is funkcióképes. Ugyanakkor a TLR liganddal aktivált pDS-L sejtek felülszójában nem tudtunk detektálni IFN- α citokint. Ezen megfigyelésünk szerint a csontvelőből származó, leukémiás pDS-ek nem képesek I-es típusú IFN termelésre, annak ellenére, hogy az ehhez szükség jelátviteli útvonal funkcióképes a sejtekben. Ez arra enged következtetni, hogy az IFN termelésükhöz szükséges további szignálokat a perifériás szövetekben kapják, melyek hozzájárulnak a leukémiás betegek tüneteinek kialakulásához.

További céljaink között szerepelt, hogy a TLR7 és TLR9 együttes aktiválásának hatását megvizsgáljuk pDS-L sejteken. A csak imiquimoddal kezelt mintákhoz képest az imiquimoddal és CpG-B-vel történő egyidejű kezelés csak kismértékben változtatta meg a sejtek CD86

expresszióját, illetve IL-6 termelését, ugyanakkor jelentősen fokozta a HLA-DQ sejtfelszíni kifejeződését. Érdekes módon az összes kísérletben, ahol kombinált aktiválást alkalmaztunk, a TLR7 által közvetített jelátvitel gátolta a TLR9-en keresztül történő aktivációt, mely összhangban van korábbi megfigyelésekkel, miszerint a TLR7 és TLR9 együttes aktiválása gátló hatást fejt ki. A gátló hatás molekuláris hátterének egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a TLR7 és TLR9 receptor között kompetíció áll fenn az Unc93B1 transzmembrán protein N-terminális doménjáért, mely kölcsönhatásba léphet a TLR-ek szerkezetileg rokon transzmembrán doménjaival a savas endo-lizoszómális kompartmentekben.

TLR-ligand, illetve vírus expozíciót követően a pDS-ek a naív T sejtek közvetlen aktiválása révén részt vesznek az adaptív immunválaszok beindításában is. Eredményeink azt mutatták, hogy a normál pDS-ekhez hasonlóan a TLR ligandokkal aktivált pDS-L sejtek is rendelkeznek T sejt aktiváló képességgel. Ugyanakkor Ugyanakkor TLR7 és TLR9 liganddal együtt aktivált pDS-L sejtek esetében jelentős mértékben csökken a sejtek T sejt stimuláló hatása. Megfigyelésünk összhangban van korábbi tanulmányokkal, melyekben leírták, hogy a TLR7/8 és TLR9 együttes aktivációja gátolja a B sejtek proliferációját, valamint a sejtek IgM termelését. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a professzionális APS-ek rokon szerkezetű TLR-einek együttes stimulációjával gátat lehetne szabni az adaptív immunrendszer túlműködésének, mint ahogy a T sejt válasza majdnem teljes mértékű felfüggesztése is megvalósítható lenne. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy eredményeink szerint a TLR7-tel és TLR9-el aktivált pDS-L sejtek fenotípusos és funkcionális tulajdonságaikban is megegyeznek a normál pDS-ekkel.

A pDS-ek a TLR7 és TLR9 endoszómális receptoraik révén érzékelik a virális RNS-t és DNS-t. Ezen virális nukleinsavak, illetve származékaik felismerése a sejten belül, a lizoszómális transzport során történik meg. Ezzel szemben a konvencionális DS-ek és alveoláris makrofágok esetében a virális RNS replikációs intermedierjeinek felismerése citoszólikus RLR-ek révén valósul meg. Korábbi tanulmányok alapján viszont elmondható, hogy a pDS-ek a TLR-eket használják a vírusok felismerésére, és ezen felismerés nem függ az RLR-ektől. Mivel a TLR-ek és RLR-ek közötti lehetséges együttműködést a vírusok felismerése során még nem tanulmányozták, munkacsoportunk célul tűzte ki a TLR aktiváció hatásának vizsgálatát az RLR-ek expressziójára. Munkacsoportunk igazolta elsőként, hogy a pDS-ek TLR7-en és TLR9-en történő aktiválása nagymértékben fokozza a RIG-I receptor

kifejeződését a sejtekben, I-es típusú IFN-ok által mediált folyamatoktól függetlenül. Továbbá ezen jelenség esetében is inkább gátló, mint szinergista hatást figyeltünk meg a vezikuláris TLR-ek együttműködését tekintve. Ez arra utalhat, hogy a TLR7 és TLR9 együttes aktiválása nem segíti elő a RIG-I expressziót, hanem inkább ezen folyamatok TLR általi szabályozását preferálja. A TLR7/9 ligandok által indukált RIG-I receptor funkcionális aktivitását igazolta azon megfigyelésünk, miszerint a pDS-ek TLR aktivációt követően képesek voltak felismerni a RIG-I receptor szintetikus ligandját, az 5'ppp-dsRNS-t. Ezen eredményeink rávilágítanak arra, hogy a TLR7/9 általi aktiváció a RIG-I receptor expressziójának fokozása révén képessé teszi a pDS-eket a citoszólikus virális nukleinsavak felismerésére is, tovább fokozva ezáltal a sejtek antivirális válaszát.

Mivel a pDS-ek által termelt I-es típusú IFN-ok sejtekre kifejtett autokrin hatása ismert, így kíváncsiak voltunk arra, hogy a TLR7/9 által indukált RIG-I expresszió fokozódását is befolyásolják-e I-es típusú IFN-ek. Kísérleteinkben a TLR7 és TLR9 aktiváció által kiváltott RIG-I kifejeződés IFNAR1 receptor elleni gátló antitestek jelenlétében is megvalósult, a primer és leukémiás pDS-ek esetében is. Ezen eredmények szerint a RIG-I kifejeződéshez vezető folyamatok függetlenek az I-es típusú IFN-ok autokrin szabályozásától. Érdekességgéppen megemlítendő, hogy az IFN-ek által szabályozott, vírus replikáció gátlásában résztvevő MxA, CXCL10 és TRAIL molekulákról leírták, hogy TLR7 aktivációt követően I-es típusú IFN-ek hiányában is expresszálódnak. Ezen jelenség hátterében a TLR7 aktiváció egy újfajta mechanizmusa áll, melyben szerepet játszik a MAPK-mediálta Tyr701-en keresztüli STAT1 foszforiláció. Korábbi tanulmányban leírták, hogy a pDS-ek 2 órás CpG DNS-sel történő aktivációja, I-es típusú IFN-ektől független módon, indukálja a MAPK függő Tyr701-en és Ser727-en történő STAT1 foszforilációt. Kísérleteinkben 90 perces TLR7/9 aktivációt követően csak a STAT1 tirozin származékán tudtunk detektálni foszforilációt. Ezen megfigyelésünk összhangban van egy friss tanulmánnyal, melyben leírták, hogy ezen tirozin származék foszforilációja egy köztes MAPK függő tirozin kináz által történik, közvetlenül megelőzve a MAPK általi STAT1 szerin foszforilációját.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a virális replikációs intermedierek felismerése során a sejtek korai I-es típusú IFN válasza TLR-ek által mediált, míg egy második hullámban bekövetkező I-es típusú IFN szekréció RLR-ek által vezérelt. Ugyanakkor ezen eredmények felvetik a kérdést, hogy milyen *in vivo* körülmények tennék szükségessé egy erős I-es típusú

IFN-okat indukáló faktorokkal (endoszómális TLR ligandok) kiváltott késői, igen gyenge IFN választ kiváltó mechanizmus létrejöttét, ahol az aktivációt citoszólikus dsRNA váltaná ki. Ezek alapján a TLR-ek általi akut, ugyanakkor átmeneti pDS aktiválás olyan folyamatnak tekinthető, mely során nagymennyiségű IFN jut a nyirok-, illetve vérkeringésbe, szemben olyan patológias körülményekkel, mint a nem-limfoid szövetekben zajló vírusfertőzések. Feltételezhető, hogy a fertőzés helyén akkumulálódó pDS-ek gyenge RIG-I által mediált IFN termelése elegendő lehet a hatékony antivirális válasz támogatásához, ugyanakkor ezen tér- és időbeli szabályozó mechanizmus jelentőségének feltárásához további kísérletek szükségesek.

6. Összefoglalás

A természetes immunitás egy konzervált védelmi mechanizmus, melynek legfontosabb feladatai: 1) a káros, illetve ártalmatlan antigének közötti különbségek felismerése; 2) az immunválasz első védvonalának aktiválása; 3) valamint az adaptív immunrendszer sejtjeinek toborzása, illetve aktiválása. Ezen folyamatok kulcsfontosságú koordinátorai az antigén prezentáló sejtek (APS) hálózatához tartozó dendritikus sejtek (DS). A mieloid DS-ek felfedezését követően, több mint, egy évtizeddel később a kutatók azonosították a DS-ek egy igen kicsi populációját, a plazmacitoid dendritikus sejteket (pDS). Ezen sejtek ritka előfordulása miatt, illetve igen rossz fenntarthatósága végett *ex vivo* kultúrákban, számos modell rendszert használnak a sejtek tanulmányozására, úgymint a sejtek kevert sejtpopulációkban (pl. PBMC vagy teljes vér) történő vizsgálata, malignus vagy pDS eredetű sejtvonalak alkalmazása. Hasonló nehézséget jelent, hogy specifikus, illetve megfelelő sejtfelszíni antigének hiányában a pDS-ek teljes vérből történő azonosítása igen bonyolult.

Munkánk során a két színnel történő azonosítási módszerekhez hasonlóan, kifejlesztettünk a pDS-ek „Blood Dendritic Cell Antigen” 4 (BDCA-4) pozitivitásán alapuló, egyszínű áramlási citometriás módszert, a pDS-ek teljes, perifériás vérből történő azonosítására. Eredményeink igazolták, hogy a BDCA-4 megfelelő és specifikus marker a pDS-ek frissen levett, perifériás vérből történő, egyszínű azonosításához, mivel expressziója nem változik a pDS-ek TLR7 agonistájával, imiquimoddal történő aktiválását követően sem, így a BDCA-4 önmagában elegendő a betegek pDS-einek számában történő változások nyomon követésére. Humán szisztémás lupus erythematosus (SLE) kapcsán kimutatták, hogy szervi érintettség esetében, főként a vesékben történő gyulladásos infiltráció során a pDS-ek száma lecsökken, mivel ezen sejtek a lupuszos léziókba vándorolnak, így szinte teljesen eltűnnek a vérkeringésből. Ezek alapján a pDS-ek számának meghatározása a perifériás vérben kevésbé invazív, ugyanakkor patológiailag releváns markere lehet az SLE-ben szenvedő betegek szöveti érintettségének, illetve státusza megítélésének.

A pDS-ek professzionális I-es típusú interferont termelő sejtekként kiemelkedő szerepet játszanak az antivirális immunválaszban, valamint endoszómális Toll-szerű receptoraik (TLR) révén a vírusok felismerésében. Ezen felismerési mechanizmus független a vírusok replikációjától, és hatékonyan érzékeli a nem-replikálódó vírusokat is, szemben más sejtek

citoplazmatikus RIG-I szerű helikázaival (RLH), melyek a virális replikáció termékeit képesek felismerni. Több tanulmányban is leírták, hogy a nyugvó pDS-ek kizárólag TLR-eket használnak a vírusok detektálására, ugyanakkor a TLR-ek és RLH-k közötti lehetséges együttműködést eddig még nem vizsgálták. Így munkánk során célul tűztük ki a pDS-ek TLR aktivációt követő RIG-I expressziós változásának, illetve funkcionális sajátosságainak vizsgálatát. Kísérletes eredményeinkkel demonstráltuk, hogy 1) a TLR7 és 9 liganddal aktivált pDS-ekben a RIG-I expresszió fokozódik; 2) a RIG-I expresszió fokozódása független az I-es típusú IFN-ok autokrin hatásától; 3) a TLR7 és TLR9 liganddal történő együttes aktiválás inkább gátló, mint szinergista hatással van a primer pDS-ek RIG-I expressziójának fokozódására.

Eredményeink arra utalnak, hogy a TLR-ek és a citoplazmatikus nukleinsav szenzorok a vírusfertőzések során együttműködhetnek. A nem-replikálódó vírus részecskék TLR-ek általi felismerése valószínűleg indukálja a pDS-ek azon felismerési mechanizmusait, melyek által a sejtek képesek lesznek detektálni a citoplazmatikus, vírus replikáció során keletkező virális termékeket. Eredményeink tehát a természetes immunitásban résztvevő felismerő mechanizmusok közötti újfajta kollaborációs szabályozásra hívják fel a figyelmet.

7. Kulcsszavak

Plazmacitoid dendritikus sejtek, plazmacitoid dendritikus sejt leukémia, Toll-szerű receptor, RIG-I-szerű receptor, jelátvitel, természetes immunitás, áramlási citometria

8. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Jelölt: Magyarics Zoltán

Neptun kód: D742NU

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

Nyilvántartási szám: DEENK/15/2015. PL

Tételszám:

Tárgy:

Publikációs Lista

A PhD értekezés alapján szolgáltató közlemények

- * 1. Szabó, A., **Magyarics, Z.**, Pázmándi, K., Gopcsa, L., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: TLR ligands upregulate RIG-I expression in human plasmacytoid dendritic cells in a type I IFN-independent manner.

Immunol. Cell Biol. 92 (8), 671-678, 2014.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2014.38>

IF: 4.205 (2013)

2. **Magyarics, Z.**, Csillag, A., Pázmándi, K., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening.

Cytometry A. 73 (3), 254-258, 2008.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.20529>

IF: 3.259



* Szabó Attila és Magyarics Zoltán megosztott első szerzők.



További Közlemények

3. Rouha, H., Badarau, A., Visram, Z.C., Battles, M.B., Prinz, B., **Magyarics, Z.**, Nagy, G., Mirkina, I., Stulik, L., Zerbs, M., Jägerhofer, M., Maierhofer, B., Teubenbacher, A., Dolezilzkova, I., Gross, K., Banerjee, S., Zauner, G., Malafa, S., Zmajkovic, J., Maier, S., Mabry, R., Krauland, E., Wittrup, K.D., Gerngross, T.U., Nagy, E.: Five birds, one stone: Neutralization of α -hemolysin and 4 bi-component leukocidins of *Staphylococcus aureus* with a single human monoclonal antibody.
mAbs. 7 (1), 243-254, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4161/19420862.2014.985132>
IF:4.726 (2013)
4. Sziájtó, V., Lukasiwicz, J., Gozdiewicz, T.K., **Magyarics, Z.**, Nagy, E., Nagy, G.: Diagnostic potential of monoclonal antibodies specific to the unique O-antigen of multidrug-resistant epidemic *Escherichia coli* clone ST131-O25b:H4.
Clin. Vaccine Immunol. 21 (7), 930-939, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00685-13>
IF:2.37 (2013)
5. Pázmándi, K., **Magyarics, Z.**, Boldogh, I., Csillag, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Modulatory effects of low-dose hydrogen peroxide on the function of human plasmacytoid dendritic cells.
Free Radic. Biol. Med. 52 (3), 635-645, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.022>
IF:5.271
6. Schmid, P., Selak, S., Keller, M., Luhan, B., **Magyarics, Z.**, Seidel, S., Schlick, P., Reinisch, C., Lingnau, K., Nagy, E., Grubeck-Loebenstein, B.: Th17/Th1 biased immunity to the pneumococcal proteins PcsB, StkP and PsaA in adults of different age.
Vaccine. 29 (23), 3982-3989, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.081>
IF:3.766





7. Csillag, A., Boldogh, I., Pázmándi, K., **Magyarics, Z.**, Gogolák, P., Sur, S., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Pollen-Induced Oxidative Stress Influences Both Innate and Adaptive Immune Responses via Altering Dendritic Cell Functions.
J. Immunol. 184 (5), 2377-2385, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803938>
IF: 5.745
8. Benkő, S., **Magyarics, Z.**, Szabó, A., Rajnavölgyi, É.: Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: The emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors.
Biol. Chem. 389 (5), 469-485, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2008.054>
IF: 3.035
9. Jiao, H., Tóth, B., Erdős, M., Fransson, I., Rákóczi, É., Balogh, I., **Magyarics, Z.**, Dérfalvy, B., Csorba, G., Szafliarska, A., Megarbane, A., Akatchirian, C., Dbaibo, G., Rajnavölgyi, É., Hammarström, L., Kere, J., Lefranc, G., Maródi, L.: Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups.
Mol. Immunol. 46 (1), 202-206, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.001>
IF: 3.555
10. **Magyarics Z.**, Rajnavölgyi É.: Plazmacitoid dendritikus sejtek - az I. típusú interferont termelő sejtek.
Magyar Immunol. 4 (3-4), 6-16, 2005.
11. **Magyarics, Z.**, Rajnavölgyi, É.: Professional type I interferon-producing cells: A unique subpopulation of dendritic cells.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 52 (3-4), 443-462, 2005.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.52.2005.3-4.14>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 35,932

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7,464

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

Debrecen, 2015.01.22.

Előadások

Zoltán Magyarics, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: Investigation of phenotypic properties and cytokine secretion profiles of plasmacytoid dendritic cells activated by various CpG-oligonucleotides. *DCcrest07 DC-THERA Graduate School, 25-30th March 2007., Celerina/St. Moritz, Switzerland*

Zoltán Magyarics, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: Phenotypic and functional studies on pDC-derived acute leukemia (pDCL) cells. *DCcrest08 DC-THERA Graduate School, 9-14th March 2008., Celerina/St. Moritz, Switzerland*

Zoltán Magyarics: Phenotypic properties and cytokine secretion profiles of CpG-oligonucleotide treated plasmacytoid dendritic cells. *IXth Congress of the International Foundation for Pulmonology, Allergology and Immunological Related Disorders, 30th of August, 2007., Debrecen, Hungary*

Poszter prezentációk

Zoltán Magyarics, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: Phenotypic properties and cytokine secretion profiles of CpG-oligonucleotide activated plasmacytoid dendritic cells. *4th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products - Cellular Therapy 2007, 22-23th March 2007, Regensburg, Germany*

Zoltán Magyarics, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: Investigation of phenotypic properties and cytokine secretion profiles of plasmacytoid dendritic cells activated by various CpG-oligonucleotides. *Challenges for Vaccine Development: Medical Needs and Social Implications – Semmering Conference 2007 (Vienna Vaccines), 12-15th April 2007, Baden bei Wien, Austria*

Zoltán Magyarics, Kitti Pázmándi, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: Characterisation of functional properties of plasmacytoid dendritic cell leukemia cells after treatment with toll like receptor ligands. *Club Francophone des Cellules Dendritiques, Mini-symposium: "Plasmacytoid dendritic cells and immune responses", 12-13th December 2007, Paris, France*

Zoltán Magyarics, Anikó Csillag, Kitti Pázmándi, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: Identification of plasmacytoid pre-dendritic cells by one-color flow cytometry for phenotype screening. *XXIV International Congress of ISAC (Int. Society for Analytical Cytology), 17-21th May 2008, Budapest, Hungary*

Zoltán Magyarics, Attila Bácsi, Kitti Pázmándi, Katalin Pálóczi, Éva Ranavölgyi: Investigation of the effects of treatment with Toll like receptor ligands on plasmacytoid dendritic cell leukemia cells. *TOLL 2008 - Recent Advances in Pattern Recognition, 24-27th September 2008, Lisbon, Portugal*

Zoltán Magyarics, Attila Szabó, Kitti Pázmándi, László Gopcsa, Attila Bácsi, Éva Rajnavölgyi: Cytokine production and helicase expression of leukemic plasmacytoid dendritic cells. *2nd European Congress of Immunology (ECI), 13-16th September 2009, Berlin, Germany*

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Bácsi Attilának a folyamatos támogatásáért és kiváló mentori munkájáért. Hálás vagyok Attilának, hogy megtanított a tudományos gondolkodásra, a megfelelő kérdésfelvetésekre, valamint kérdések megválaszolására alkalmas kísérleti tervek létrehozására.

Köszönet illeti Prof. Dr. Rajnavölgyi Évát, aki folyamatosan támogatott és inspirált doktori képzésem ideje alatt.

Hálával tartozom Dr. Lányi Árpádnak, Dr. Kis-Tóth Katának és Dr. Benkő Szilviának a hasznos tudományos megbeszélésekért, értékes javaslataikért, valamint laboratóriumi munkám során nyújtott segítségükért, melyet az Immunológiai Intézetben eltöltött éveim alatt kaptam tőlük. Külön köszönet illeti Csillag Anikót, Szabó Attilát és diákomat, Pázmándi Kittit az általuk nyújtott manuális segítségért, valamint a laboratóriumban eltöltött szép pillanatokért. Különösen hálás vagyok Dr. Gogolák „Gogy” Péternek, aki kiváló tanárom volt az áramlási citometria és a sejtszortolás fortélyainak elsajátítása során.

Szeretnék köszönetet mondani az Immunológiai Intézet (Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar) összes munkatársának a folyamatos támogatásukért, illetve az általuk teremtett barátságos légkörért.

Végül, de nem utolsó sorban őszintén szeretném kifejezni hálámat családomnak, különösképpen feleségemnek, Katának, valamint gyermekeimnek az érzelmi támogatásért, bátorításért, és hogy segítettek átvészelni a nehéz időszakokat.