

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Az autofágiát szabályozó sejtfelszíni SLAMF5 receptor és a mitokondriális ROS hatása a dendritikus sejtek funkcióira**

**Agod Zsófia**

Témavezető: Dr. Lányi Árpád



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2018

## **Az autofágiát szabályozó sejtfelszíni SLAMF5 receptor és a mitokondriális ROS hatása a dendritikus sejtek funkcióira**

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

Írta:  
**Agod Zsófia**  
általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Lányi Árpád, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora  
Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja és helyszíne: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Immunológiai Intézet, ÉTK 2.209  
2018. szeptember 28., 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sármai Gabriella, az MTA doktora  
Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Buzás Edit, az MTA doktora  
Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora  
Prof. Dr. Sármai Gabriella, az MTA doktora  
Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja: 2018. szeptember 28., 13 óra,  
helyszíne: a Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

## **1. Bevezetés**

A dendritikus sejtek (DC) a mikroorganizmusok széles repertoárjának valamint a szövetkárosodás jeleinek felismerése révén a környezet változásainak kifinomult érzékelőjeként szolgálnak. Ezen túlmenően, kiemelkedő szereppel bírnak a patogének és tumorok elleni védelmi mechanizmusok koordinálásában és annak biztosításában, hogy az immunválasz ne egészséges saját struktúrák ellen irányuljon. A DC-k funkciójuk betöltése során különféle stressz hatásoknak vannak kitéve, mely számos adaptációs mechanizmus kialakulásához vezetett. Például, a sejt homeosztázisát megzavaró körülmények, mint a fertőzések is, hatással vannak a sejtlegzés során keletkező mitokondriális reaktív oxigén gyökök (mtROS) mennyiségére. A megemelkedett mtROS termelés ezt követően bizonyos fehérjék reverzibilis oxidációján keresztül képes a környezetben bekövetkező változásoknak megfelelően alakítani a sejtfunkciókat.

A sejt homeosztázisának fenntartását biztosító autofágia szintén fontos szereppel bír a patogének elleni védelemben. Egyrészt közvetlenül, a citoplazmába jutó kórokozók eltávolítása révén, másrészt a szisztémás immunválasz részeként, a veleszületett és szerzett immunrendszer szabályozásán keresztül. Habár a ROS termelés és az autofágia a veleszületett immunitás legősibb mechanizmusai, mégis a szerzett immunválasz és a gyulladásos folyamatok fő szabályozói közé tartoznak. Így az intracelluláris kórokozók elleni immunválasz valamint a gyulladásos folyamatok szabályozásának jobb megértése érdekében célul tűztük ki a fokozott mtROS termelés hatásainak tanulmányozását, valamint az autofágia folyamatát szabályozó molekulák azonosítását DC-kben.

### **1.1 A dendritikus sejtek kulcsfontosságúak az immunválasz kialakulásában és szabályozásában**

A DC-k szervezetünkben szétszórta, minden szövetünkben megtalálhatóak. Mintázatfelismerő receptoraik (PRR) révén képesek a mikrobiális struktúrák megkülönböztetésére valamint olyan saját struktúrák felismerésére, amelyek szöveti sérülés következtében válnak hozzáférhetővé az immunrendszer számára. PRR-on keresztüli aktivációjuk egyaránt nélkülözhetetlen a veleszületett és szerzett immunválasz kiváltásához. A DC-k a hematopetikus sejtek egy igen heterogén sejtpopulációját alkotják, melyek szöveti lokalizációjuk, sejtfelszíni markereik és funkcionális sajátágaik alapján két fő csoportba sorolhatók: konvencionális DC-k (cDC) és plazmacitoid DC-k (pDC).

#### **1.1.1. A pDC-k egyedi PRR mintázatuk révén hatékony antivirális immunválaszt biztosítanak a fertőzés korai és késői fázisában egyaránt**

A pDC-k az I-es típusú interferonok (IFN) fő forrásai, melyek sejtjeinkben antivirális állapotot alakítanak ki, ezzel gátolva a vírusok terjedését. Ugyanakkor a T-, B-, és NK sejtek valamint a

cDC-k aktivitásának fokozásával az antivirális immunválaszt is erősítik. Fiziológias körülmények között a pDC-k a limfoid szervekben és a vérben lokalizálódnak. Aktivációt követően azonban a gyulladt szövetekbe vándorolnak, ahol lokálisan gátolják a vírus terjedését. A vírusfertőzés kezdetén a pDC-k a vérben és a limfoid szervekben találhatóak, ahol nem fertőző vírus partikulumokat illetve fertőzött sejtekből származó apoptotikus testeket kebelezhetnek be. A felvett virális struktúrákat ekkor endoszomális TLR7 és TLR9 receptorokon keresztül ismerik fel. Endoszomális TLR receptoraik által aktiválódva gyors, nagy mennyiségű I-es típusú IFN termeléssel válaszolnak. Emellett az aktiváció előidézi a pDC-k gyulladt szövetekbe vándorlását valamint indukálja a RIG-I receptor kifejeződését, melynek ligandumkötése ezt követően hozzájárul az I-es típusú IFN-ok második hullámának kiváltásához a fertőzés helyén.

### **1.1.2. A cDC-kben zajló autofágia hozzájárul a fertőző ágensek számának és a potenciálisan szövetkárosító citokinek mennyiségének korlátozásához**

A cDC-k kulcsszerepet játszanak a gyulladási reakcióban, amely a gyors antimikrobiális válasz kialakulásához és az adaptív immunválasz megfelelő aktiválásához is szükséges. Mivel potenciálisan bármely immunválasz károsíthatja saját szöveteinket, a túlzott gyulladás elkerüléséhez és a homeosztázis fenntartásához ezen folyamatok szigorú kontrollja szükséges. Napjainkra számos tanulmány igazolta az autofágia központi szerepét a potenciálisan káros, veleszületett immunválaszok korlátozásában. Autofágia révén a sejt saját komponenseit kettős membránnal körülvett vezikulába, úgynevezett autofagoszómába zárja, majd lizoszómák közreműködésével lebontja a tápanyagok újrahasznosítása valamint a rendellenes organellek és fehérje aggregátumok eltávolítása céljából. Az oxidált proteinek és organellek valamint a ROS túlermeléséért felelős károsodott mitokondriumok eltávolítása által az autofágia számos olyan endogén veszélyjeltől szabadítja meg a sejtet, melyek máskülönben gyulladási folyamatot válthatnának ki. Az immunválasz aktivációs küszöbértékének emelésével, az autofágia megakadályozza az immunrendszer indokolatlan nyugalmi állapotban történő aktivációját. Bizonyos helyzetekben azonban, az autofágia erősíti a fertőzések elleni védelmet. Egyrészt közvetlenül, a sejt citoplazmájába jutó patogének lebontása révén, ami feltehetően az eukarióta sejtek egyik legősibb védelmi mechanizmusa. Másrészt, a hivatásos antigén prezentáló sejtekben különösen intenzíven zajló autofágia a citoplazmában lévő mikrobiális nukleinsavakat és antigéneket az endoszómába juttatja így elősegítve endoszomális TLR receptorok általi felismerésüket valamint MHC-II-függő prezentációjukat a CD4<sup>+</sup> T sejtek számára. Ezen túlmenően, a keringésből a fertőzés helyére vándorló monociták cDC-vé illetve makrofággá történő differenciációja szintén autofágia-függő folyamat. A közelmúltban derült fény arra, hogy TLR4-függő aktivációt követően a cDC-kben ideiglenesen csökken az autofágia. Ennek feltételezhető

célja a saját antigének prezentációjának csökkentése az erős ko-stimulációs jelek jelenlétében, ezáltal az autoreaktív T sejtek aktivációjának gátlása. A későbbiekben azonban az autofágia intenzitása helyreáll, mely megakadályozza a citokinek túltermelődését, ezáltal csökkentve a gyulladás mértékét.

## **1.2. Az mtROS és a SLAMF receptorok immunmoduláló szerepe**

A DC-k funkciói szigorú tér- és időbeli szabályozás alatt állnak, ami szükséges a megfelelő immunválasz kialakításához. Ennek érdekében a DC-k aktivációja számos környezeti faktornak, a sejt metabolikus állapotának és az immunsejtek közötti kommunikációnak is függvénye. Míg bizonyos receptorok, ligandumok vagy akár szerves molekulák nélkülözhetetlenek az immunválasz elindításában, mások esetleg moduláló, azonban korántsem elhanyagolható szereppel bírnak annak szabályozásában.

### **1.2.1. Az mtROS hatása a jelátviteli folyamatokra**

A ROS kémiaiailag reaktív molekulák csoportja, amelyek magas koncentrációban a fehérjéket, lipideket és DNS-t oxidálva károsíthatják sejtösszetevőinket. Kontrollált termelődésükkor azonban, specifikus célpontok reverzibilis oxidációja révén, más poszt-transzlációs módosításokhoz hasonlóan, képesek a jelátviteli utak szabályozására. A ROS egyik fő endogén forrása a mitokondrium elektrontranszportlánc (ETC). Az oxigén az ETC végén végső elektron akceptorként szolgálva vízzé redukálódik. Azonban az elektronok szivárgása, főként az ETC I-es és III-as komplexeinél, az oxigén részleges redukációjához vezet, ami mtROS képződését eredményezi. Míg ezek az I-es komplexnél a mátrixba kerülnek, addig a III-as komplexnél a mitokondrium belső membránjának mindkét oldalán megjelennek. Mivel a III-as komplex által generált membrán közötti térbe kerülő ROS-nak elég a mitokondrium külső membránján átjutnia ahhoz, hogy a citoplazmába kerüljön, potenciálisan jelátviteli molekulaként szolgálhat. Számos környezeti faktor növelheti a mtROS mennyiségét, többek között az aktivált fagociták által termelt ROS és TNF is. A mikroorganizmusok és azok komponensei szintén fokozhatják az mtROS termelődését. Az mtROS-vezérelt redox-reakciók a fehérje-fehérje kölcsönhatásoknak, a transzkripciós faktorok DNS-kötő képességének valamint az enzimek katalitikus aktivitásának megváltoztatásával módosíthatják a jelátviteli útvonalakat. Érdekes, hogy a redox-folyamatok hatással vannak más poszt-transzlációs módosításokra is, például a foszforilációra. Redox szabályozás a ROS keletkezéséhez vezető stimulus hatására a sejt egy adott területére lokalizálva játszódik le. Számos irodalmi adat támasztja alá a PRR útvonalak ROS általi szabályozását, azonban az mtROS pDC-k vírusfelismerésére kifejtett hatása még nem ismert. Mivel a pDC-k korai I-es típusú IFN termelése endoszomális TLR receptorok által vezérelt, míg annak késői fázisában a citoszolikus RIG-I receptor is részt vesz, a

pDC-k ideálisak arra, hogy az mtROS különböző elhelyezkedésű PRR-ok jelátvitelére gyakorolt hatását tanulmányozhassuk. A pDC-eket azonban problémás az *in vitro* vizsgálatokhoz szükséges mennyiségben szeparálni az emberi szervezetből (a perifériás vérben található mononukleáris sejteknek mindössze 0,2-0,8%-át teszik ki), így legtöbb kísérletünket a GEN2.2 humán pDC sejtvonalon végeztük. Ezt követően az mtROS TLR9- és RIG-I-mediált I-es típusú IFN termelésre kifejtett hatását egészséges véradók perifériás véréből származó primer pDC-ken is igazoltuk.

### **1.2.2. A SLAMF receptorok szerepe az autofágia szabályozásában**

A mikrobák PRR-vezérelt felismerése mellett, a gyulladásos folyamatok szabályozásában fontos szerep jut a sejtek közötti kommunikációnak, melyet részben sejtfelszíni receptorok, többek között a SLAMF receptorok biztosítanak. A SLAMF receptorok hematopoetikus sejtek felszínén expresszálódnak és főként homoasszociáció révén aktiválódnak. Az utóbbi években egyre nagyobb figyelem irányul az autofágia immunitásban betöltött szerepére, azonban arról, hogy a folyamat hogyan szabályozódik immunsejtekben, még keveset tudunk. A közelmúltban kimutatták, hogy a SLAMF1 és SLAMF4 receptorok képesek az autofágia szabályozására. Hatásukat a Beclin-1/Vps34 makrokomplexen keresztül fejtik ki, mely az autofágia kezdeti lépéséért felelős. Az említett makrokomplex stabilizálásán keresztül a SLAMF1 autofágiát fokozó hatását figyelték meg humán krónikus limfocitás leukémia sejtekben. Ezzel szemben a SLAMF4 receptornak a makrokompleksszel történő asszociációja csökkenti annak lipid kináz aktivitását, így az autofágia gátlását eredményezi humán monocitoid THP1 és egér csontvelő eredetű makrofágokban. Habár cDC-ken számos SLAMF receptor expresszálódik, funkciójukról keveset tudunk. A különböző immunsejtekben megismert autofágiát moduláló szerepük alapján elképzelhető, hogy a SLAMF receptorok az autofágia folyamatának szabályozásán keresztül fejtik ki hatásukat a cDC funkciókra. Kísérleteinkkel a humán cDC-ken konstitutívan jelen lévő SLAMF5 receptort tanulmányoztuk arra keresve a választ, hogy a receptor befolyásolja-e a cDC-kben az autofágia folyamatát valamint a gyulladásos citokinek termelését, és ha igen, milyen molekuláris mechanizmuson keresztül. Vizsgálataink során a cDC-eket monocitákból differenciáltatott DC-kkel (moDC) modelleztük.

### **1.3. Célkitűzések**

#### **1.3.1. Kísérleteink célja az mtROS pDC-k antivirális funkcióira kifejtett hatásának meghatározása volt**

- vizsgálva a pDC-k TLR9- és RIG-I-mediált I-es típusú IFN termelését az mtROS emelkedett szintjének jelenlétében,
- azonosítva az mtROS molekuláris targetjeit, mely révén a TLR9 és RIG-I jelátviteli útvonalak módosítása történik.

#### **1.3.2. Vizsgálataink során tanulmányozni kívántuk a SLAMF5 sejtfelszíni receptor cDC funkciókban betöltött szerepét**

- megállapítva a SLAMF5 hatását az LPS/IFN $\gamma$ -val kezelt cDC-k fenotípusára és citokintermelésére,
- meghatározva a receptor autofágiára kifejtett hatását,
- feltérképezve a háttérben álló molekuláris mechanizmust.

## 2. Anyagok és módszerek

### 2.1. Humán pDC-k és monociták izolálása perifériás vérből

Kísérleteinkhez a humán pDC-eket és monocitákat egészséges véradók perifériás véréből nyertük ki. A perifériás vér mononukleáris sejteihez (PBMC) Ficoll-Paque (GE Healthcare) oldattal történő sűrűség-alapú gradiens centrifugálással jutottunk. A primer pDC-eket PBMC-ből izoláltuk pozitív szelekción alapuló mágneses sejtszeparáló kit, a humán CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit (Miltenyi Biotech) segítségével VarioMACS mágneses állványon. A frissen izolált sejteket 48-lyukú tenyésztő lemezen  $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  sejtsűrűségben RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) tápfolyadékban szétosztottuk. A tápfolyadékot 10% végkoncentrációjú hőinaktivált magzati borjú savóval (Life Technologies) 2 mM L-glutaminnal, 100 U  $\text{ml}^{-1}$  penicillinnel, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycinnel (Sigma-Aldrich) valamint 50 ng  $\text{ml}^{-1}$  rekombináns IL-3 citokinnel (PeproTech) egészítettük ki.

A monocitákat a PBMC-ből a humán CD14 MicroBead Kit (Miltenyi Biotech) segítségével pozitív szelekción alapuló mágneses sejtszeparálással nyertük ki követve a gyártó által megadott utasításokat.

### 2.2. RNS interferencia és humán moDC-k *in vitro* differenciációja

A SLAMF5 géncsendesítéséhez a következő Stealth™ RNAi oligonukleotidokat (ThermoFisher Scientific) használtuk:

SLAMF5 kódoló: 5'-UGGCUAUGUUCUUUCUGCUUGUUCU-3'

SLAMF5 komplementer: 5'-AGAACAAGCAGAAAGAACAUAAGCCA-3'

neg. kontroll kódoló: 5'-UGGUAUGCUUUCUGUUCGUUUCUCU-3'

neg. kontroll komplementer: 5'-AGAGAAACGAACAGAAAGCAUACCA-3'

Az IRF8- (Assay ID: s7100) és TRIM21-(Assay ID: s13462) specifikus Silencer Select siRNS-eket és a Silencer Select negatív kontroll siRNS-t a ThermoFisher Scientific-től rendeltük. A kettős szálú siRNS-eket elektroporáció útján GenePulser Xcell (Bio-Rad Laboratories) használatával juttattuk a frissen szeparált monocitákba. A transzfektált sejteket ezt követően 5 napig tenyésztettük 24-lyukú tenyésztő lemezen  $10^6 \text{ ml}^{-1}$  sejtsűrűségben RPMI 1640 médiumban (ThermoFisher Scientific). A tápfolyadékot 100 U  $\text{ml}^{-1}$  penicillinnel, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  streptomycinnel (Sigma-Aldrich) és 10 % végkoncentrációjú hőinaktivált magzati borjú savóval (ThermoFisher Scientific) egészítettük ki (teljes médium). A differenciációhoz szükséges citokineket, a 80 ng  $\text{ml}^{-1}$  GM-CSF-et (Gentaur Molecular Products) és 100 ng  $\text{ml}^{-1}$  IL-4-et (PeproTech) a differenciáció 0. és 2. napján adtuk a sejtekhez.



### **2.3. GEN2.2 sejt kultúra fenntartása**

A GEN2.2 humán plazmacitoid dendritikus sejt vonalat mitomycin C-vel (Sigma-Aldrich) kezelt egér MS5 sejtek rétegén tenyésztettük RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich), melyet 10 % vékonykoncentrációjú hőinaktivált magzati borjú savóval (Life Technologies), 100 U ml<sup>-1</sup> penicilinnel, 100 µg ml<sup>-1</sup> streptomycinnel (Sigma-Aldrich) és 5% nem-esszenciális aminosavakkal (Life Technologies) egészítettük ki. A kísérletekhez a GEN2.2 sejteket eltávolítottuk a dajka sejtekről és 24 lyukú tenyésztő lemezekre helyeztük át.

### **2.4. MtROS indukálása és detektálása**

Az mtROS termelésének monitorozásához a GEN2.2 sejteket 5 µM vékonykoncentrációjú MitoSox<sup>TM</sup> mitokondriális szuperoxid indikátorral (Life Technologies) töltöttük fel a gyártó által megadott utasításoknak megfelelően. Az mtROS fokozásának érdekében a sejteket 0,5 µg ml<sup>-1</sup> Antimycin-A (AMA; Sigma-Aldrich) jelenlétében inkubáltuk 6 órán át. Annak ellenőrzésére, hogy a detektált fluoreszcens jel valóban az mtROS fokozott termelésének a következménye, párhuzamos kísérletekben a sejteket 300 µM MitoTEMPO-val (Sigma-Aldrich), egy mitokondriumokban halmozódó antioxidánsal is kezeltük 1 órával az AMA kezelést megelőzően és azzal egyidőben. Az mtROS szintjének meghatározásához a különböző kezeléseket követően a festékkel feltöltött sejtek fluoreszcencia intenzitását FACS Calibur áramlási citométerrel 580 nm hullámhosszon mértük, az adatokat pedig FlowJo szoftverrel (Treestar) elemeztük.

### **2.5. A SLAMF5 receptor keresztökötése**

Az moDC-eket a differenciáció 5. napján összegyűjtöttük és teljes médiumban 10<sup>7</sup> ml<sup>-1</sup> sejtsűrűségű szuszpenzióba hoztuk. A sejteket 10 µg ml<sup>-1</sup> koncentrációjú anti-SLAMF5 (klón: 152-1D5; LifeSpan BioSciences, Cat.No. LS-C134663) vagy IgG izotípus kontroll (Biolegend, Cat.No. 400124) antitesttel inkubáltuk folyamatos keverés mellett 4 °C-on 45 percig. Ezt követően a sejteket teljes médiummal mostuk, majd 10 µg ml<sup>-1</sup> anti-egér IgG F(ab')<sub>2</sub> fragmentumának (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Cat.No. 115-006-062) jelenlétében 24 lyukú tenyésztő lemezen 37 °C-on 2 órán át inkubáltuk.

### **2.6. Sejtek aktiválása**

A TLR9-mediált I-es típusú IFN termelés kiváltásához a GEN2.2 sejteket valamint primer pDC-eket 1 µM CpG-A-val (ODN 2216; Cat.No. HC4037; Hycult Biotech) kezeltük 6 órán át. A RIG-I receptor expressziójának indukálásához a GEN2.2 sejteket illetve a primer pDC-eket 0,25 µM CpG-A jelenlétében inkubáltuk 16 órán át. A RIG-I-függő aktivációhoz ezt követően a sejteket 2-szer

mostuk friss médiummal majd  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  végkoncentrációjú 5'ppp-dsRNS-sel (Cat.No. t1rl-3prna; InvivoGen) kezeltük őket a Lyovec (InvivoGen) transzfekciós rendszert alkalmazva.

Az moDC-k aktiválása a TLR4 receptor agonista LPS (Ultrapure lipopolysaccharide-Salmonella minnesota R595, Cat.No. t1rl-smlps) és rekombináns humán IFN $\gamma$  (PeproTech, Cat.No. 300-02) együttes alkalmazásával történt. Az autofágia intenzitásának növeléséhez az éretlen moDC-eket 50 nM rapamycinnel (Merck, Cat.No. 553210) kezeltük 4 órán át. Bizonyos kísérleteknél az aktiváció utolsó 2 órájában a sejtek 20 nM bafilomycin A1- (BafA1; InvivoGen, Cat.No. t1rl-baf1) vagy 1  $\mu\text{M}$  MG132-kezelésnek (SelleckChem, Cat.No. S2619) voltak kitéve.

## 2.7. Western blot analízis

A sejteket Laemmlli pufferben lizáltuk, majd a fehérje extraktumokat poliakrilamid gél elektroforézissel szétválasztottuk és nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories) transzferáltuk nedves elektro-blottolással. A membrán fehérjementes területeinek blokkolásához 5%-os zsírszegény tejport tartalmazó TBS-Tweent illetve a foszfo-IRF3 esetében 5%-os BSA-t használtunk. A membránokat a következő specifikus antitestekkel jelöltük: anti-RIG-I (Cat.No. 4520), anti-foszfo-IRF7 (Ser477; Cat.No. 12390), anti-IRF7 (Cat.No. 4920), anti-IRF3 (Cat.No. 4302), anti-MAVS (Cat.No. 3993), anti-foszfo-p70S6K (Thr389; Cat.No. 9206), anti-p70S6K (Cat.No. 9202), anti-IRF8 (Cat.No. 5628S) a Cell Signaling-tól, anti-SLAMF5 (clone H128), anti- $\beta$ -aktin (Cat.No. sc-47778), anti-Akt1 (Cat.No. sc-5298), anti-ubikvitin (Cat.No. sc-9133), anti-TRIM21 (Cat.No. sc-25351) a Santa Cruz Biotechnology-tól, anti-EAT-2 (Cat.No. LS-C169054, LifeSpan BioSciences), anti-LC3 (Cat.No. NB100-2220, Novus Biologicals), anti-foszfo-Akt (Ser473; Cat.No. AF887, R&D System) valamint anti-foszfo-IRF3 (S386; Cat.No. ab76493, Abcam). A kötődő primer antitestek jelenlétét a membránon tormaperoxidázzal konjugált másodlagos anti-nyúl illetve anti-egér ellenanyagokkal detektáltuk. A jelet lumineszcencián alapuló detektálási rendszerrel és filmexpozícióval tettük láthatóvá. A felvitt fehérjelizátumok egyenlő mennyiségét a  $\beta$ -aktin expressziójának vizsgálatával erősítettük meg. A kapott jel erősségének mennyiségi meghatározását követően a célfehérje relatív expresszióját a  $\beta$ -aktin fehérjére, míg a foszforiláció mértékét az adott protein összmennyiségére normalizálva határoztuk meg.

## 2.8. RNS izolálás, cDNS szintézis és valós idejű kvantitatív PCR

A teljes RNS-t a TriReagent (Molecular Research Center) lizáló reagenssel nyertük ki a sejtekből. A teljes RNS 1  $\mu\text{g}$ -ját DNase I (Thermo Scientific) kezelésnek vetettük alá a genom DNS eltávolítása érdekében, majd reverz transzkripció PCR technikával cDNS-t készítettünk High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) felhasználásával. A cDNS-ekben valós idejű kvantitatív PCR módszerrel határoztuk meg a célgének relatív expresszióját. A folyamathoz Dream

Taq DNA Polymerase-t (Thermo Scientific) és az alábbi génekre specifikus esszéket használtuk: IFNA1 (Assay ID Hs.PT.49a.3184790.g), cyclophilin az Integrated DNA Technologies-tól valamint IRF8 (TermoFisher Scientific, Assay ID: Hs00175238\_m1). A PCR reakciót ABI StepOnePlus (Applied Biosystems) készülékekkel végeztük el. A génamplifikáció ciklusainak küszöbértékét (CT) StepOne Software 2.1 segítségével határoztuk meg. A cyclophilin háztartási gén expressziós szintjéhez viszonyítottuk a célgének expressziós szintjét ( $2^{-\Delta CT}$ ).

## **2.9. Áramlási citometriás mérések**

A sejtek életképességének meghatározásához  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  koncentrációjú 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Sigma-Aldrich) festékkel 15 percig inkubáltuk a sejteket, közvetlenül az áramlási citometriás mérés előtt. A kezeléseket követően a DC-k sejtfelszíni markereinek expressziójában bekövetkező változásokat a következő fluoreszcens festékkel konjugált monoklonális antitestekkel detektáltuk: FITC-konjugált anti-HLA-A, B, C (Sony Biotechnology), anti-HLA-DQ, anti-CD40 (BioLegend), PE-jelölt anti-SLAMF5 (BioLegend, klón 1.21), anti-CD14, anti-CD86 (R&D Systems), anti-DC-SIGN (Sony Biotechnology) és APC-konjugált anti-CD1a (BioLegend). Kontrollként minden esetben az adott sejtfelszíni antigen elleni monoklonális antitesttel megegyező izotípusú, jelölt antitesteket használtunk. Az autofágia intenzitásának meghatározása a Cyto-ID Autophagy detection kit (Enzo Life Sciences) felhasználásával történt. Az aktivációt követően a sejteket Cyto-ID festékkel inkubáltuk 30 percig  $37^\circ\text{C}$ -on, majd közvetlenül mosást követően végeztük az áramlási citometriás méréseket. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur áramlási citométerrel határoztuk meg, az adatokat pedig FlowJo szoftverrel (TreeStar) elemeztük.

## **2.10. A sejtek által termelt citokinek koncentrációjának meghatározása ELISA módszerrel**

Aktivációt követően a sejtek felülúszójában az IL-1 $\beta$  és IL-12 szintjét a BD-OptEIA Human ELISA kitek segítségével határoztuk meg. A szekretált IL-23 mennyiségét a humán IL-23 ELISA Ready-Set Go kit alkalmazásával detektáltuk. Az IFN $\alpha$  szekréció követéséhez pedig a PBL InterferonSource-tól rendelt humán IFN $\alpha$  ELISA kit-et használtuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az abszorbanciát Synergy HT microplate olvasó (Bio Tek Instruments) segítségével 450 nm hullámhosszon detektáltuk.

## **2.11. Statisztikai elemzés**

Az adatok átlagát  $\pm$  SD feltüntetésével ábrázoltuk. Minden eredmény legalább három független kísérletből származik. A statisztikai számítások elvégzéséhez és az adatok ábrázolásához GraphPad Prism v.6. software-t használtunk. Az adatok statisztikai analizésére Student-féle páratlan kétoldali

*t*-próbát valamint ANOVA-t alkalmaztunk Bonferroni post-hoc teszttel. Szignifikánsnak tekintettük a különbségeket, ha a  $p < 0.05$ .

### **3. Eredmények**

#### **3.1. Az mtROS moduláló hatása a pDC-k I-es típusú IFN termelésére**

##### **3.1.1. Az mtROS szintjének fokozása GEN2.2 sejtekben Antimycin-A-val, a III-as komplex gátlószereivel**

A pDC-k alacsony sejtszáma a perifériás vérben korlátozza antivirális funkcióik alaposabb megismerését. Ezen limitáló tényező elkerülése érdekében kísérleteink többségében a GEN2.2 humán plazmacitoid sejtvonalat használtuk, mely a primer pDC-knek széles körben elfogadott modellje. Az utóbbi évek kutatásai szerint a ROS mennyiségének fokozása a vírusok által stimulált jelátviteli utak egyik kulcsfontosságú szabályozója. Annak vizsgálatára, hogy a mitokondriumok által termelt ROS milyen hatással vannak a pDC-k PRR-mediált aktivációjára, a GEN2.2 sejteket Antimycin-A-val (AMA) kezeltük. Az AMA a III-as komplex gátlásán keresztül fokozza a ROS felszabadulását a mitokondriális mátrixba és az intermembrán térbe. A mitokondriumokban szelektíven halmozódó szuperoxidot detektáló MitoSox<sup>TM</sup> fluoreszcens festék valamint az antioxidáns hatású MitoTEMPO alkalmazásával megállapítottuk, hogy  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  AMA optimális a ROS felhalmozódásának indukciójához GEN2.2 sejtekben.

Ezen kísérletek alapján a GEN2.2 sejtek AMA kezelésével modellezhető a pDC-k redox állapotában vírusfertőzések során végbemenő változások.

##### **3.1.2. Az mtROS emelkedett szintje csökkenti a GEN2.2 sejtek CpG-A-indukált I-es típusú IFN termelését az IRF7 foszforilációjának gátlásán keresztül**

Először azt vizsgáltuk, hogy az mtROS fokozott termelődésének milyen következményei vannak a pDC-k TLR9-en keresztül indukált IFN $\alpha$  termelésére. A TLR9 ligandum CpG-A szignifikánsan fokozta mind az IFN $\alpha$ 1 mRNS mennyiségét mind az IFN $\alpha$  protein szekrécióját, melyet az AMA kezelés által megemelt mennyiségű mtROS jelentősen csökkentett. Annak vizsgálatára miként befolyásolja a megemelkedett mtROS a TLR9 jelátviteli útvonalat a következőkben az mtROS-nak az IRF7 foszforilációjára kifejtett hatását tanulmányoztuk, mely transzkripciós faktor nélkülözhetetlen a TLR-indukált I-es típusú IFN gének transzkripciójában pDC-kben. Kimutattuk, hogy a CpG-A-indukált IRF7 foszforiláció szignifikánsan csökken AMA jelenlétében.

Összefoglalva, ezen kísérletek demonstrálják, hogy az mtROS fokozott termelődése GEN2.2 sejtekben blokkolja az I-es típusú IFN-ok CpG-A-indukált transzkripcióját és szekrécióját, feltételezhetően az IRF7 fehérje foszforilációjának gátlásán keresztül.

### **3.1.3. Az mtROS emelkedett szintje gátolja a CpG-A-indukált RIG-I expressziót GEN2.2 sejtekben**

Míg nyugvó pDC-kben a RIG-I receptor nagyon kis mennyiségben van jelen, expressziója endoszomális TLR ligandumok hatására jelentősen fokozódik. Ezen korábbi megfigyelések alapján kísérleteink során megállapítottuk, hogy GEN2.2 sejtekben 0,25  $\mu$ M CpG-A 16 órás expozíciója az optimális a RIG-I expressziójának kiváltásához. Érdekes módon a CpG-A-val egyidejű AMA kezelés nagymértékben korlátozta a RIG-I receptor indukcióját.

Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy az mtROS emelkedett szintje az I-es típusú IFN-válasz korai hulláma mellett az endoszomális TLR-indukált RIG-I expressziót is gátolja.

### **3.1.4. Az mtROS felerősíti a RIG-I-indukált I-es típusú IFN termelést GEN2.2 sejtekben**

Habár eddigi eredményeink szerint az mtROS erősen gátolja a RIG-I receptor megjelenését, egyelőre nem tudjuk miként befolyásolja a RIG-I-függő pDC-aktivációt abban az esetben, ha az mtROS mennyisége a receptor indukcióját követően fokozódik. Ezért a következőkben azt vizsgáltuk, milyen hatással van az mtROS a GEN2.2 sejtek RIG-I-indukált I-es típusú IFN termelésére. Összhangban a primer pDC-ken korábban leírtakkal, a CpG-A stimulációt követő RIGL kezelés növelte az IFNA1 gén transzkripciót és az IFN $\alpha$  szekréciót GEN2.2 sejtekben is. Érdekes módon, AMA jelenlétében a RIGL még nagyobb mértékű IFNA1 mRNS és IFN $\alpha$  fehérje termelődést váltott ki. Ezen adatok alapján az mtROS kontextus-függő módon szabályozza a GEN2.2 sejtek I-es típusú IFN termelését. A következő kísérleteink annak felderítésére irányultak, hogy az mtROS ellentétes hatása a GEN2.2 sejtek I-es típusú IFN válaszára a PRR típusától, vagy a sejt aktiváltsági állapotától függ az mtROS indukció idején. Ebből a célból az előzetes CpG-A (0,25  $\mu$ M) kezelést követően RIGL helyett CpG-A egy nagyobb dóziséval (1  $\mu$ M) stimuláltuk újra a sejteket AMA jelenlétében és hiányában. Az mtROS emelkedett szintje gátolta a CpG-A restimuláció által indukált I-es típusú IFN-termelést, ami azt sugallja, hogy a mtROS PRR-függő módon szabályozza a pDC-k I-es típusú IFN termelését.

### **3.1.5. Az mtROS ellentétes hatást fejt ki a primer pDC-k TLR9- illetve RIG-I mediált I-es típusú IFN-termelésére**

Eddigi vizsgálataink során humán transzformált pDC sejtvonalat használtunk. Annak ellenőrzésére, hogy a GEN2.2 sejtekben megfigyeltek primer pDC-kben is fennállnak, egészséges véradók perifériás véréből primer pDC-eket izoláltunk, majd a sejteket a GEN2.2 sejtekhez hasonlóan aktiváltuk. Ezen kísérletek igazolták, hogy a GEN2.2 sejtvonalon végzett megfigyelésünknek

megfelelően az mtROS gátolja a pDC-k CpG-A-indukált I-es típusú IFN-termelését miközben szignifikánsan fokozza a RIGL-dal történő aktiválás hatását.

Ezek az eredmények megerősítik az mtROS kontextus-függő szabályozó szerepét a humán pDC-k TLR9- és RIG-I-mediált I-es típusú IFN termelésében.

### **3.1.6. Az mtROS pozitívan szabályozza a RIG-I útvonal kulcsfontosságú jelátviteli molekuláit**

Megfigyeléseink alapján, miszerint az emelkedett mtROS szint elősegíti a pDC-k RIG-I közvetített vírusellenes hatását, a következőkben a RIG-I útvonal komponenseinek mtROS-mediált szabályozását vizsgáltuk. Az IRF3 kulcsfontosságú a RIG-I-mediált I-es típusú IFN gének átírásában. Ennek megfelelően, az IRF3 foszforilációjának indukcióját figyeltük meg RIGL hatására, mely egyidejű AMA kezelés esetén tovább fokozódott. Korábbi jelentésekkel összhangban a MAVS adapter molekula expressziójának és az Akt kináz foszforilációjának redox-dependens emelkedését figyeltük meg, mely fehérik az IRF3 aktivitásának fokozásán keresztül hozzájárulnak a sejtek RIG-I függő I-es típusú IFN termeléséhez.

Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy az mtROS a RIG-I jelátviteli útvonal komponenseire gyakorolt közvetlen, aktiváló hatásán keresztül fokozza a pDC-k RIG-I-indukált I-es típusú IFN-termelését.

Összefoglalva, a fent bemutatott eredményeink az mtROS sokoldalú, kulcsfontosságú szerepét tárják fel a humán pDC-k vírusellenes reakcióinak korai és késői fázisában egyaránt, függően attól, hogy mely PRR-on keresztül észleli a sejt a vírusfertőzést.

## **3.2. A SLAMF5 receptor fokozza az autofágiát és szabályozza az moDC-k citokin termelését az IRF8 stabilizálásán keresztül**

### **3.2.1. A SLAMF5 receptor expressziója fokozódik az moDC-k differenciálódása valamint aktiválása során, azonban nem szükséges a sejtek túléléséhez és fenotípusos éréséhez**

Az moDC-k differenciálódása során számos immunmoduláló funkcióval rendelkező sejtfelszíni molekula expressziójában figyelhető meg változás. Kísérleteink során a SLAMF5 szignifikáns indukcióját detektáltuk a monociták DC-vé differenciálódása során, mely arra utal, hogy a SLAMF5 szerepet játszhat ebben a folyamatban. A SLAMF5 moDC funkciókban betöltött szerepének vizsgálatához egészséges véradók perifériás véréből izolált monocitáiban RNS interferencia technikával gátoltuk a SLAMF5 kifejeződését. Beavatkozásunk révén a SLAMF5 expressziója mintegy 80-95%-kal csökkent, mialatt a sejtek életképessége változatlan maradt. Megállapítottuk, hogy a monocitákon nagymértékben kifejeződő, azonban DC-ken nem expresszálódó CD14,

valamint a DC-ken megjelenő DC-SIGN molekulák mennyisége azonos a SLAMF5-hiányos és kontroll sejteken, mely azt sugallja, hogy a monociták DC-vé differenciálódása jelentősen csökkent mennyiségű SLAMF5 jelenlétében is végbemegy. Mivel LPS/IFN $\gamma$  kezelés hatására emelkedett SLAMF5 expressziót detektáltunk, a következőkben a receptor moDC aktivációra kifejtett hatását tanulmányoztuk. Az MHC-I, MHC-II, CD40 és CD86 molekulák expressziójából ítélve azonban a SLAMF5-hiányos sejtek fenotípusa a kontroll sejtekkel megegyező módon változik LPS/IFN $\gamma$  hatására.

### **3.2.2. Az autofágia modulációja moDC-kben a SLAMF5 receptoron keresztül**

A közelmúltban derült fény arra, hogy a SLAMF receptorok bizonyos immunsejtekben részt vesznek az autofágia folyamatának szabályozásában. A következő kísérleteink tehát arra irányultak, hogy meghatározzuk milyen hatással van a SLAMF5 jelátvittele az moDC-kben zajló autofágiára. A folyamat követésére széles körben használt módszer az LC3 fehérje lipid-konjugációjának mérése western blot technikával, mellyel láthatóvá tehető az LC3-I/LC3-II átalakulás. Az autofagoszómák keletkezésének méréséhez az LC3-II degradációját bafilomicin A1-gyel (BafA1) gátoltuk, mely megakadályozza az autofagoszóma lizoszómával történő fúzióját. A SLAMF5-csendesített moDC-kben a kontroll sejtekben megfigyelhetőnél alacsonyabb LC3-II szintet detektáltunk nyugalmi állapotban és LPS/IFN $\gamma$  kezelést követően egyaránt. A fenti kísérletet BafA1 alkalmazása nélkül is elvégeztük, annak ellenőrzésére, hogy a SLAMF5 géncsendesítése esetén gátolt-e az autofagoszóma-lizoszóma fúzió illetve a lizoszómális degradáció. Az LC3-II szintje ilyen körülmények között is alacsonyabb volt SLAMF5 hiányában, ami azt tükrözi, hogy SLAMF5 hiányában a keletkező autofagoszómákba kerülő anyagok degradációja zavartalan. Ezen eredmények alapján a SLAMF5 feltételezhetően az autofagoszómák kialakulásához szükséges. A SLAMF5 autofágiát fokozó hatását a Cyto-ID fluoreszcens festék alkalmazásával erősítettük meg, mely élő sejtekben szelektíven kötődik az autofagoszómák kettős membránjához, így az autofagoszómák mennyisége áramlási citometriával nyomon követhető. A fenti eredményekkel összhangban, a SLAMF5 receptor agonista ellenanyaggal (152.1D5) történő keresztkötése növelte az LC3-II szintjét BafA1 jelenlétében és hiányában egyaránt.

Ezen kísérletek alapján moDC-kben a SLAMF5 szükséges a bazális autofágia fenntartásához, valamint annak LPS/IFN $\gamma$ -stimulációt követő helyreállításához.

### **3.2.3. A SLAMF5 az mTOR-tól független mechanizmussal szabályozza az autofágiát**

További kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a SLAMF5 az mTOR-on, az autofágia egyik fő gátló molekuláján keresztül fejt-e ki hatását. Amennyiben a SLAMF5 hiányában tapasztalt autofágia csökkenés az mTOR fokozott aktivitásának a következménye, az mTOR blokkolása várhatóan

mérsékli a SLAMF5 géncsendesítésének a hatását. Megfigyeléseink szerint azonban az mTOR inhibitor rapamicin jelenléte nem enyhíti a SLAMF5 hiányában tapasztalható autofágia blokkot. Feltevésünk további teszteléséhez LPS/IFN $\gamma$  kezelést követően 4 órás időablakban vizsgáltuk az mTOR-t aktiváló Akt kináz valamint az mTOR szubsztrát p70S6K foszforilációját. SLAMF5 hiányában azonban nem tapasztaltunk az Akt-mTOR-p70S6K útvonal fokozott aktivitására utaló nagyobb mértékű foszforilációt.

Ezek az eredmények együttesen azt sugallják, hogy a SLAMF5 az mTOR-tól független útvonalon szabályozza az autofágiát.

#### **3.2.4. A SLAMF5 autofágiát fokozó hatása az IRF8 TRIM21-mediált proteozómális degradációjának gátlásán keresztül valósul meg**

A SLAMF5 autofágiát moduláló hatása mögött álló molekuláris mechanizmus feltárása érdekében a következőkben az IRF8 transzkripció faktorra összpontosítottunk, mely az autofágia egyik fő pozitív szabályozója. Microarray vizsgálatok alapján az egér csontvelő eredetű DC-k nyugalmi állapotban alacsony szinten fejezik ki az IRF8-at, míg LPS/IFN $\gamma$  kezelés hatására a transzkripció faktor expressziója nagymértékben fokozódik, mely aztán számos autofágia-asszociált protein átírását segíti elő. Először is, az IRF8 siRNS-mediált géncsendesítésével megállapítottuk, hogy az IRF8 az egér DC-khez hasonlóan humán moDC-kben is szükséges az autofágia folyamatához. Ezt követően szemléltettük, hogy IRF8 hiányában a korábban említett SLAMF5-specifikus agonista antitest autofágiát serkentő hatása megszűnik, mely arra utal, hogy a receptor az IRF8-on keresztül fejt ki a hatását a folyamatra. SLAMF5-hiányos sejtekben az IRF8 fehérje szignifikánsan csökkent mennyiségét detektáltuk, mRNS szinten azonban nem tapasztaltunk eltérést. A sejteket a proteozóma inhibitor MG132 jelenlétében aktiválva a SLAMF5-hiányos sejtekben a kontrollal megegyező mennyiségű IRF8 fehérjét detektáltunk, ami arra utal, hogy a SLAMF5 az IRF8 proteozómális degradációjára van hatással. Korábbi megállapításokkal összhangban, miszerint a TRIM21 E3 ubikvitin ligáz poliubikvitináció révén proteozómális degradációra jelöli ki az IRF8-at, eredményeink szerint a SLAMF5 csendesítéssel kiváltott fokozott IRF8 degradáció a TRIM21 jelenlétéhez kötött. Végül demonstráltuk, hogy a humán moDC-k sem nyugalmi állapotban sem LPS/IFN $\gamma$  hatására nem expresszálják az EAT-2-t, a SLAMF receptorok egyetlen ismert adapter molekuláját APC-kben, ezzel kizártuk annak közreműködését a SLAMF5 jelátvitelében.

Ezen eredmények alapján, habár a SLAMF5-csendesített moDC-k képesek az IRF8 szintézis aktiváció-függő fokozására, mégis csökkent mennyiségű IRF8-cal rendelkeznek a fehérje fokozott proteozómális degradációja miatt. Ez a folyamat TRIM21 függő, azonban független a SLAM család adapter molekulájától, az EAT-2-től. A SLAMF5 autofágiát serkentő hatása mögött tehát



feltehetően az IRF8 fehérje stabilizálása áll, mely az autofágia folyamatában résztvevő gének egyik fő transzkripciós faktora.

### **3.2.5. A SLAMF5- illetve IRF8-hiányos moDC-k egymással átfedő fenotípussal és citokin profillal rendelkeznek**

Annak megerősítésére, hogy a SLAMF5 csendesítés moDC-funkciókra gyakorolt hatása az IRF8 lebomlásának a következménye, a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az IRF8 csendesítésével kiválthatóak-e a SLAMF5-hiányos moDC-kben megfigyelhető változások. Egy korábbi tanulmány szerint az autofágia blokádjá a monocita-DC differenciáció során csökkent CD1a expresszióval rendelkező moDC-k kialakulásához vezet. Adataink azt mutatják, hogy SLAMF5 illetve IRF8 hiányában, összhangban a csökkent autofágiával, kisebb arányban képződnek CD1a<sup>+</sup> moDC-k.

Az autofágia szükséges a cDC-k pro-inflammatorikus citokin termelésének korlátozáshoz, így hiányát túlságosan intenzív gyulladási válasz jellemzi. Ezzel összhangban, a SLAMF5- és IRF8-hiányos moDC-kben megfigyelt csökkent autofágia az IL-1 $\beta$  és az IL-23 citokinek fokozott szekréciójával társul. Érdekes módon azonban mind a SLAMF5- mind az IRF8-hiányos sejtekre az IL-12 csökkent szekréciója jellemző, amely a citokin IRF8-függő termelésének a következménye. Adataink alapján, miszerint az IRF8 hiánya a SLAMF5-csendesített moDC-kben észleltékhez hasonló fenotípusos és funkcionális változásokat eredményez, a SLAMF5 feltételezhetően az IRF8-on keresztül szabályozza az autofágiát.

Összefoglalva, munkánk fény derített a SLAMF- és az IRF8 jelátviteli útvonalak kapcsolatára, mely révén a SLAMF5 humán moDC-kben az autofágiát és citokin termelést modulálni képes.

#### 4. Megbeszélés

Annak érdekében, hogy a patogének eliminálása a szervezet saját struktúráinak károsítása nélkül valósulhasson meg a DC funkciók szabályozásában számos faktor játszik szerepet, beleértve az adott szöveti környezetben zajló sejt-sejt interakciókat valamint a sejt saját mitokondriumaiból származó jelzéseket is. Munkánk során részletesebben tanulmányoztuk a mitokondriumokból származó ROS hatását a pDC-k antivirális válaszára valamint a sejt-sejt kommunikáció szabályozó szerepét a SLAMF5 sejtfelszíni receptor cDC funkciókban betöltött szerepének feltárásán keresztül. Vírusfertőzés esetén a ROS keletkezésének és eltávolításának dinamikus egyensúlyában változások következnek be. A ROS emelkedett szintje hatással lehet a fertőzött sejtek és immunsejtek funkcióira, a vírusok osztódására valamint hozzájárulhat a fertőzések patogeneziséhez is. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy a primer humán pDC-k TLR7-mediált funkciói különösen érzékenyek az oxidatív stresszre. Mivel a gyulladás helyére vándorló pDC-k a vérkeringésből kilépve olyan szöveti környezetbe kerülnek, ahol oxidatív stressz éri őket, a TLR-mediált útvonalak ekkor feltehetően gátoltak. Jelen munkánk során bizonyítást nyert, hogy az exogén forrásból származó ROS-hoz hasonlóan az mtROS szintén korlátozza az endoszómális TLR-indukált IFN $\alpha$  termelést, függetlenül a pDC-k aktiváltsági állapotától. Ezzel szemben, a RIG-I receptor jelátvitelére az mtROS pozitív hatást fejt ki. Kimutattuk továbbá, hogy a RIG-I útvonal bizonyos komponenseinek működésére, mint az IRF3 transzkripciós faktor, a MAVS adapter molekula valamint az Akt protein kináz, az mtROS magasabb koncentrációja pozitív hatással van. Ezen megfigyeléseink alapján úgy véljük, hogy míg a vírusfertőzések korai fázisában a pDC-k szisztémás I-es típusú IFN-válaszát a TLR által közvetített jelek vezérlik, a perifériás szövetekben zajló késői lokális antivirális funkciókért elsősorban a RIG-I útvonal felelős.

Ezen megállapítások azonban felvetik a kérdést, hogy az mtROS-nak ez a kontextus-függő hatása a pDC-k I-es típusú IFN termelésére miért előnyös a gazdaszervezet számára? Feltételezésünk szerint a ROS emelkedett szintje a periférián az egészséges szövetek védelme érdekében korlátozza a TLR-mediált I-es típusú IFN termelést. Nem meglepő tehát, hogy számos vírus fejlesztett ki stratégiát a mtROS szintjének növelésére, amely a fent említett szabályozó mechanizmuson át hozzájárulhat a pDC-k TLR-mediált antivirális válaszához. A fent leírt eredmények talán legjelentősebb felfedezése, hogy a vírusok által kiváltott oxidatív stressz esetén a RIG-I jelátvitel kompenzálhatja a TLR útvonal funkcionális hiányát. A TLR aktivációt követően indukálódó RIG-I receptor pDC-kben tehát kulcsfontosságú lehet ezen virális elkerülő mechanizmus megakadályozásában. Az evolúció során a vírusok számos megoldást találtak a veleszületett immunrendszer védelmi mechanizmusainak elkerülésére, amely folyamatos evolúciós hajtóerőként szolgál a gazdaszervezet számára a vírusfertőzések leküzdésére szolgáló mechanizmusok kialakítására. Elképzelhető, hogy a TLR és RIG-I útvonalak együttműködése valamint aktivitásuk

ellentétes irányú változása a pDC-k redox állapotának függvényében, a vírusok és gazdaszervezet között dúló véget nem érő harc egyik következményeként alakult ki.

Az autofágia szintén jelentős szerepet játszik a patogének elleni védelemben, miközben gyulladást csökkentő hatása révén biztosítja saját szöveteink épségét. Eredményeink alapján a SLAMF5 sejtfelszíni receptor hozzájárul az moDC-kben különösen intenzíven zajló autofágia fenntartásához, feltehetően az IRF8 transzkripciós faktor degradációjának gátlásán keresztül. A közelmúltban megjelent publikációk humán perifériás vérből származó mononukleáris sejteken végzett kísérletekkel bizonyították, hogy az autofágia blokája, akár a PI3K gátló 3-metil-adeninnel akár az Atg7 autofágia-asszociált protein csendesítésével, fokozza a sejtek LPS vagy Mycobacterium tuberculosis (Mtb) által kiváltott IL-1 $\beta$  termelését. Hasonlóképpen, az autofágia gátlása moDC-kben az IL-23 fokozott szekréciójához vezetett, míg az autofágia indukciója a citokin csökkent termelését eredményezte. Eredményeink szerint a SLAMF5- és az IRF8-hiányos moDC-kre egyaránt az autofágia-gátolt sejteknél megfigyelt fokozott IL-1 $\beta$  és IL-23 termelés jellemző LPS/IFN $\gamma$  stimulációt követően. Mindazonáltal, mind a SLAMF5-, mind az IRF8-csendesített sejtek csökkent mennyiségű IL-12-t termeltek. Ez látszólag ellentmond korábbi tanulmányoknak, amelyek az IL-12 termelés növekedéséről számolnak be az autofágia blokája esetén. Ezt megfigyelték egér mieloid sejtekben az Atg5 autofágia-asszociált protein hiányában Mtb infekció során, valamint mikroglában PI3K-inhibitor 3-metil-adeninnel történő kezelést illetve Atg5 vagy Beclin-1 csendesítést követő LPS-stimuláció során. Ez a diszkrepancia azonban könnyen magyarázható azzal, hogy makrofágokban az LPS/IFN $\gamma$ -indukált IL-12 termelés IRF8 függő, és mint kísérleteink bizonyítják, humán moDC-ben is az.

A gyulladással kapcsolatos folyamatok korlátozása mellett az autofágia az intracelluláris kórokozók közvetlen eltávolításában is részt vesz. Ennek következtében számos intracelluláris kórokozó fejlesztett ki az autofágia elkerülésére szolgáló mechanizmusokat. Egy friss tanulmány demonstrálta, hogy a fertőzött betegek szérumból származó hepatitis C vírus (HCV) blokkolta a differenciálódó monocitákban az autofágia folyamatát, amely a képződő moDC-k csökkent CD1a expressziójában nyilvánult meg. A szerzők felvetették, hogy az autofágia blokádján keresztül gátolt moDC differenciáció része lehet a HCV menekülési stratégiájának. Adataink azt mutatják, hogy SLAMF5 valamint IRF8 hiányában hasonlóképp csökkent a CD1a<sup>+</sup> sejtek aránya.

Míg az autofágia minden sejtünkre jellemző, a SLAMF5 kizárólag hematopoetikus sejteken expresszálódik, így lehetőséget teremthet arra, hogy szelektíven növeljük az autofágia intenzitását ezen sejtekben. Egyelőre azonban nem rendelkezünk információval arról, hogy más immunsejtekben is hasonló hatással van-e erre a folyamatra. Tekintve az autofágia kedvező hatásait az antimikrobiális immunválasz során, fokozása immunsejtekben előnyös lehet a fertőző betegségek kezelésében. Összességében, kísérleteinkkel fényt derítettünk a SLAMF és az IRF8 jelátviteli utak

közötti kapcsolatra, melyen keresztül a sejtfelszíni SLAMF5 receptor fokozni képes a cDC-kben zajló autofágiát. További kísérletek szükségesek annak megállapításához, hogy ez az új útvonal hogyan alkalmazható az autofágia és a gyulladásos folyamatok modulálására fertőző és/vagy autoimmun betegségek terápiájának javítása érdekében.

## 5. Összefoglalás

Napjainkra nyilvánvalóvá vált, hogy a gyulladás az immunválasz nélkülözhetetlen része. A szabályozatlan, túlságosan intenzív, vagy krónikus gyulladás azonban kiterjedt szövethárosodást okoz, mely számos kórkép kialakulásához vezethet, beleértve autoimmun illetve tumoros megbetegedéseket. A dendritikus sejtek (DC) két fő alpopulációja, a konvencionális (cDC) valamint a plazmacitoid DC-k (pDC) meghatározó szerepet töltenek be a gyulladásos válasz elindításában és mértékének szabályozásában. Munkánk során átfogóan tanulmányoztuk a DC-k intracelluláris patogének elleni védelmi mechanizmusait befolyásolni képes intra- és intercelluláris kommunikációs folyamatokat. Kísérleteinkkel sikerült részletesebben megismernünk a mitokondriális eredetű reaktív oxigén gyökök (mtROS) TLR- és RIG-I receptorok jelátvitelére kifejtett hatását pDC-ben, valamint a SLAMF receptor családba tartozó SLAMF5 sejtfelszíni molekula autofágiára gyakorolt hatását cDC-ben.

A metabolikus változások vagy stressz hatására megemelkedett mtROS termelés a vírusok által stimulált jelátviteli utak egyik kulcsfontosságú szabályozója is. Eredményeink szerint emelkedett mtROS jelenlétében jelentősen csökken a pDC-k TLR9 agonisták által indukált I-es típusú interferon (IFN) termelése, döntően az útvonalban központi szereppel bíró IRF7 transzkripciós faktor foszforilációjának gátlásán keresztül. Ezzel ellentétben, a RIG-I agonista által indukált I-es típusú IFN gének kifejeződésére pozitív hatást gyakorol a fokozott mtROS termelés, mely ezen jelátviteli útvonal pozitív szabályozóinak fokozott aktivációjának következménye. A kísérleteink során azonosított mechanizmuson keresztül a pDC-k képesek a vírusok érzékelésére és I-es típusú IFN-ok termelésére a gyulladásos környezetben is, ahol a magasabb ROS koncentráció következtében a TLR9-indukált jelátvitel gátolt.

A SLAMF receptorok hematopoetikus sejtek felszínén expresszálódnak, elősegítve az immunsejtek közötti kommunikációt. Megfigyeléseink alapján a SLAMF5 receptor azon kevés sejtfelszíni molekulák közé sorolható, melyek képesek az autofágia folyamatának szabályozására. Eredményeink azt mutatják, hogy a SLAMF1 és SLAMF4 receptoroktól eltérően, melyek a Vps34/Beclin-1 komplexen keresztül szabályozzák ezt a folyamatot, a SLAMF5 az autofágiát szabályozó gének egyik fő transzkripciós faktorán, az IRF8 fehérjén keresztül fejt ki hatását. Megállapítottuk, hogy a SLAMF5 a TRIM21 E3 ubikvitin ligáz gátlása révén képes gátolni az IRF8 proteasomális degradációját. Kimutattuk továbbá, hogy az autofágiát szabályozó funkciójának megfelelően a SLAMF5 jelátvitel hatással van a monocita-DC differenciáció során a CD1a<sup>+</sup> sejtek arányára, valamint összhangban a receptor IRF8 stabilizáló hatásával, LPS/IFN $\gamma$  aktivációt követően befolyásolja az IL-1 $\beta$ , IL-23 és IL-12 citokinek termelését.

A ROS és az autofágia krónikus gyulladásban, autoimmun betegségekben és rákban betöltött szerepét tekintve, az itt bemutatott új mechanizmusok hozzájárulhatnak e betegségek jobb megértéséhez és esetleg kezeléséhez.

## 6. Publikációk



**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/103/2018.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Agod Zsófia  
Neptun kód: IWCMYY  
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Agod, Z., Pázmándi, K. L., Bencze, D., Vereb, G., Bíró, T., Szabó, A., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A., Engel, P., Lányi, Á.: Signaling Lymphocyte Activation Molecule Family 5 Enhances Autophagy and Fine-Tunes Cytokine Response in Monocyte-Derived Dendritic Cells via Stabilization of Interferon Regulatory Factor 8.  
Front. Immunol. 9 (62), 2018.  
IF: 6.429 (2016)
2. Agod, Z., Fekete, T., Budai, M. M., Varga, A., Szabó, A., Moon, H., Boldogh, I., Bíró, T., Lányi, Á., Bácsi, A., Pázmándi, K. L.: Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells.  
Redox Biol. 13, 633-645, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.016>.  
IF: 6.337 (2016)





### További közlemények

3. Pázmándi, K. L., Agod, Z., Kumar, B. V., Szabó, A., Fekete, T., Somogyi, V., Veres, Á., Boldogh, I., Rajnavölgyi, É., Lányi, Á., Bácsi, A.: Oxidative modification enhances the immunostimulatory effects of extracellular mitochondrial DNA on plasmacytoid dendritic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 77, 281-290, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.028>  
IF: 5.736
4. Szabó, A., Osman, R. M., Bacskai, I., Kumar, B. V., Agod, Z., Lányi, Á., Gogolák, P., Rajnavölgyi, É.: Temporally designed treatment of melanoma cells by ATRA and polyI:C results in enhanced chemokine and IFN $\beta$  secretion controlled differently by TLR3 and MDA5. *Melanoma Res.* 22 (5), 351-361, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e328357076c>  
IF: 2.518

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 21,02**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):**  
12,766

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, 2018.04.23.





## **Prezentációk**

Agod Zs, Lányi Á: Characterization of CD84 splice variants in immunocompetent cells. 39th Congress of the Hungarian Immunological Society, 4-7. November 2010, Szeged, Hungary

Agod Zs, Lányi Á: The role of SLAM receptors in the regulation of dendritic cell functions. 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 4-7. January 2012, Galyatető, Hungary

Agod Zs, Lányi Á: Differential regulation of TLR- and CD40-induced dendritic cell functions by SLAM-family receptors. 26th Annual European Macrophage & Dendritic Cell Society Meeting, August 31-September 2. 2012, Debrecen, Hungary

Agod Zs, Lányi Á: The role of SLAMF1 and SLAMF5 in the CD40L- and TLR-induced dendritic cell functions. 41th Congress of The Hungarian Immunological Society, 17-19. October 2012, Debrecen, Hungary

Agod Zs, Lányi Á: SLAMF5 is a regulator of CD40L-induced dendritic cell responses. 8th ENII Immunology Summer School, May 27 - June 03. 2013, Alghero, Italy

Agod Zs, Lányi Á: SLAMF5 is a regulator of CD40L-induced responses in plasmacytoid dendritic cells. 7th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 7-10. January 2014, Galyatető, Hungary

Agod Zs, Lányi Á: SLAMF5 regulates the inflammatory character of plasmacytoid dendritic cells. 13th International Symposium on Dendritic Cells, 14-18 September 2014, Tours, France

Agod Zs, Lányi Á: DC autophagy in response to LPS and IFN $\gamma$  is controlled by SLAMF5 via p38 and IRF8. 30th Annual European Macrophage & Dendritic Cell Society Meeting, 21-23. September 2016, Amsterdam, Netherlands

Agod Zs, Lányi Á: SLAMF5, a novel positive regulator of DC autophagy. 46th Congress of the Hungarian Immunological Society, 18-20. October 2017, Velence, Hungary

## **7. Tárgyszavak**

dendritikus sejt, mitokondriális ROS, SLAMF5, Toll-szerű receptor, RIG-I, interferon, autofágia, anti-virális immunválasz, gyulladás

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Lányi Árpádnak, aki megtanított a tudományos gondolkodásra, bevezetett a laboratóriumi munka világába, segítette tudományos tevékenységem elvégzését és ötleteim megvalósítását mindig lelkesen támogatta.

Külön köszönet Pázmándi Kittinek, aki megismertette velem a csapatmunka varázsát. Szeretnék köszönetet mondani az építő jellegű kritikákért valamint inspiráló iránymutatásaiért, amelyek nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Köszönetet mondok Bácsi Attilának és Koncz Gábornak értékes szakmai tanácsaikért és segítőkészségükért.

Köszönettel tartozom Veres Ágotának, aki megbízható laboratóriumi munkájával elősegítette kísérleteim gyors és hatékony megvalósítását.

Köszönettel tartozom kiváló tanítványomnak, Bencze Dórának, a kutatói munkámban való közreműködéséért.

Köszönet a szerzőtársaknak kitűnő munkájukért és szakmai segítségükért.

Hálával tartozom a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézetében dolgozó minden munkatársamnak a hasznos tudományos megbeszélésekért, mellyel hozzájárultak doktori értekezésem elkészüléséhez valamint az általuk teremtett barátságos légkörért és a munkahelyen szerzett szép pillanatokért.

És legfőképpen köszönet Viktornak és édesapámnak, akik mindvégig érdeklődéssel követték tanulmányaimat és önzetlenül támogattak céljaim elérésében.