

Szakmai záró beszámoló

Vírusok detektálása által és intercelluláris kapcsolatokon keresztül indukált szignálok integrációja dendritikus sejtekben (2017-2022)

NKFIH azonosító: NN125613

Vezető kutató: Dr. Széles Lajos

Megjegyzés: a szakmai zárójelentéshez az aktuális tájékoztató (<https://nkfi.gov.hu/palyazoknak/elektronikus-rendszer/jelentest-keszito-kutatoknak-zarojelentes>) nem jelzi, hogy a beszámolót angolul kell elkészíteni. Mivel erre külön kitérnek az összefoglaló és a hasznosítással kapcsolatos nyilatkozat esetében, ezért (korábbi zárójelentéseket is megnézve) arra jutottam, hogy a jelentés magyarul is elkészíthető vagy így készítené el. Szükség szerint, az angol verziót is megírom és benyújtom.

1. Bevezetés és az eredmények áttekintése

A dendritikus sejtek (DC-k) alapvető szerepet a különböző immunválaszok szabályozásában. A DC-k vizsgálata fontos az immunrendszer működésének megértéséhez és az immunbetegségek mechanizmusának megismeréséhez. A génexpressziót kutató szakemberek ezen túl olyan molekuláris események tanulmányozására is használják a DC-eket (hasonlóan a makrofágokhoz), mint a sejt- és stimulus-specifikus génaktiváció vagy a szignálintegráció. A támogatott kutatás (NN125613) eredeti alapkérései a DC-k által detektált szignálok integrációjához kapcsolódtak. Számos, a szignálok integrációjával kapcsolatos eredményünk bekerült a közleményeinkbe, viszont a korábbi célkitűzéseinkhez képest a fő hangsúly az antivirális programokra és az interferon reguláló faktorok (IRF) vizsgálatára került át, alapvetően két okból.

Az első ok az volt, hogy az elvégzett kísérleteink során több esetben azt tapasztaltuk, hogy a szignálintegráció fehérje szinten és sejtválaszok szintjén nem olyan kifejezett, mint azt a transzkripciós eredményeink alapján feltételeztük. Például az RNA-seq adatok alapján 271 gén mutatott szinergista szabályozást. Ezen géneknek csak egy része (n=160) volt detektálható tömegspektrométer alapú proteomikával, még kisebb hányaduknál volt a szinergia kimutatható fehérje szinten (n=25). A vírus fertőzésekkel kapcsolatos eredményeink azt mutatták, hogy a vírus-indukált válaszok nem voltak kifejezettebbek a TLR3 és TLR9 útvonalakat együttesen aktiváló DNS vírusok (HSV1, Adenovírus) esetében, mint az +ssRNS vírusok (Rhinovírus, Enterovírus) esetében, amelyek csak a TLR3-t aktiválják. A szakmai záró beszámoló 5. pontjában röviden ismertetjük azokat az elvégzett kísérleteket, amely a szignálok integrációjával kapcsolatosak, de a közleményekben nem, vagy csak részben kerültek ismertetésre.

A második ok az volt, hogy a tervezett és elvégzett kísérletek analízise közben olyan megfigyeléseket tettünk, melyeket korábban csak kevésbé vizsgáltak. Ezen jelenségekkel kapcsolatos eredményeinket, a már elvégzett kísérletek eredményeit felhasználva két tudományos közleményben publikáltuk. Az első közlemény esetében az alapvető megfigyelésünk az volt, hogy TLR útvonalak által aktivált IRF3 és IRF5 kötőhelyei csak részben fednek át, pedig a két IRF hasonló DNS motívumot (ISRE félhelyet) ismer fel. A vizsgálatainkat kiterjesztettük egy harmadik IRF-re (IRF9), és további kísérletekkel és elemzésekkel vizsgáltuk az IRF-specifikus kötések jellegzetességeit. A második közleményben bemutatásra kerültek azon eredményeink, melyek azzal kapcsolatosak, hogy az IRF-ek kötését hogyan módosítja több agonista együttes alkalmazása. A második tanulmány esetében a transzkriptomikai adatok elemzése során azt figyeltük meg, hogy az interferon stimulálta gének (ISG) egy csoportja (az ún. effektor ISG-k) esetében a TLR szignálok gátolják egymást, a második ligand rontotta a hatékonyabb ligand hatását. Ez alapvetően ellentétes volt a gyulladásos citokinek szabályozásával, ahol az additív vagy szinergista hatás volt az általános. A kézirat első verzióiban a két géncsoport szabályozását párhuzamosan, együtt mutattuk be. Ezen a szerkezeten részben terjedelmi okokból, részben a bírálók javaslatai alapján később változtatnunk kellett. A végleges, publikált verzióban a hangsúly az effektor ISG-k génszabályozó régióinak jellemzésére került, bemutatva szignálintegrációval (TLR ligandok kombinált hatása a génexpresszióra) és gyulladásos citokinekkel (pl. promóter kromatin nyitottság) kapcsolatos eredményeinket is.

2. A támogatással létrejött közlemények

Csumita, M., Csermely, A., Horváth, A., Nagy, G., Monori, F., Göczi, L., Orbea, H., Reith, W., Széles, L.: Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5' and 3' flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin environment in a combinatorial fashion. *Nucleic Acids Res.* 48 (2), 589-604, 2020.

IF: 16.971

Göczi, L., Csumita, M., Horváth, A., Nagy, G., Pólska, S., Pigni, M., Thelemann, C., Dániel, B., Mianesaz, H., Varga, T., Sen, K., Raghav, S., Schoggins, J., Nagy, L., Acha-Orbea, H.*, Meissner, F.*, Reith, W.*, Széles, L.*: A Multi-Omics Approach Reveals Features That Permit Robust and Widespread Regulation of IFN-Inducible Antiviral Effectors. *Joint authorship. *J. Immun.* 209 (9), 1-12, 2022.

IF: 5.426 (2021)

3. Az IRF3-, IRF5- és IRF9-specifikus kötőhelyeinek feltérképezése és jellemzése

Az IRF család három tagjának kötési sajátosságait vizsgáltuk funkcionális genomikai módszerekkel. Azonosítottuk az IRF3, IRF5 és IRF9 közös és specifikus genomi kötőhelyeit, és megvizsgáltuk ezek jellegzetességeit. Először ChIP-seq kísérleteket végeztünk az IRF-ek kötőhelyeinek feltérképezéséhez. A CD8⁺ DC sejteket 90 percig kezeltük CpG-vel, pIC-vel vagy IFN β -al. Ezek az agonisták hatékonyan aktiválják a következő jelátviteli útvonalakat: pIC $\rightarrow$ TLR3 $\rightarrow$ IRF3; CpG $\rightarrow$ TLR9 $\rightarrow$ IRF5 és IFN β $\rightarrow$ IFNAR1/2 $\rightarrow$ IRF9. Azokkal a kötőhelyekkel dolgoztunk tovább, melyek egy adott minta mindkét replikájában azonosíthatóak voltak. Az IRF3, IRF5 és IRF9 kötési régióinak feltérképezése után azonosítottuk azokat a genomi régiókat, melyeket valamelyik IRF dominánsan kötött. Meghatároztuk az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék normalizált lefedettségi értékeit, majd IRF3, IRF5 és IRF9 kötőhelyeket hét csoportba (klaszterbe) soroltuk: (1) IRF3-domináns, (2) IRF5-domináns, (3) IRF9-domináns (4) IRF3-IRF5, (5) IRF3-IRF9 (6) IRF5-IRF9, és (7) mindhárom IRF közös kötőhelyei. Egy genomi régiót akkor tekintettünk IRF3-, IRF5- vagy IRF9-domináns régiónak, ha az adott IRF normalizált lefedettségi értéke legalább kétszer magasabb volt, mint a másik két IRF arra a régióra számoltatott lefedettségi értéke. Azokat a régiókat, ahol az IRF3, IRF5 és IRF9 lefedettségi értéke hasonló volt, azaz a hányadosok rendre 0,5 és 2,0 között voltak, közös klaszternek tekintettük. A három további klaszterbe olyan régiók tartoztak, amelyekben az egyik IRF fehérje kötődése az adott genomi régióhoz gyengébb volt, mint a másik két domináns IRF kötődése.

Az IRF3, IRF5 és IRF9 közös és specifikus genomi kötőhelyeinek jellemzése során megvizsgáltuk, hogy van-e különbség az IRF-domináns klaszterek között DNS motívumok előfordulása szempontjából. Három módszerrel elemeztük a DNS-motívumokat: (1) „de novo” motívum kereséssel, (2) súlyozott motívum mátrixok (position weight matrixes, PWMs) feldúsulásainak elemzésével és (3) specifikus DNS-szekvenciák keresésével.

Az első módszer azt mutatta, hogy az IRF3- és IRF9-domináns klaszterekben a leginkább feldúsult DNS-motívum az ISRE. A korábbi IRF5 ChIP-seq vizsgálatokhoz hasonlóan, a „de novo” motívum kereséssel nekünk sem sikerült azonosítani ISRE motívumot az IRF5-domináns klaszterben, azonban az ISRE félhely és gyenge IRF-ETS kompozit elem (IECS) feldúsulást mutatott. Ezek mellett az IRF-kötő motívumok mellett számos egyéb motívumot is azonosítottunk, klaszterenként más-más gyakorisággal, köztük az NF- κ B kötőhelyét (KB vagy NFKB), a TPA válaszelemet (TRE), a cAMP válaszelemet (CRE) és az IFN γ aktivációs szekvenciát (GAS). Ezek a motívumok, olyan faktorok kötőrégiói, amelyek együtt aktiválódnak bizonyos IRF-fehérjékkel. A TLR aktiválás során az IRF3 vagy IRF5 együtt aktiválódik az AP-1 család tagjaival, melyek a TRE vagy CRE motívumokhoz kötődnek, és az NF- κ B család tagjaival, melyek az NFKB motívumhoz kötődnek. Az I-IFN-ok indukálják az ISGF3 komplex kialakulása mellett a STAT1 homodimereket is, melyek a GAS motívumhoz kötődnek.

A második megközelítésünk során PWM-ek feldúsulását vizsgáltuk a klaszterekben. A HOMER adatbázisból és újrakezelt ChIP-seq adatokból gyűjtöttünk IRF faktorok kötőhelyeiként azonosított elemek PWM-jeit. Az ISRE, EICE, IECS és az együttesen aktivált faktorok motívumai (NFKB, TRE, CRE és GAS) mellett három hosszabb motívumot is vizsgáltunk. Az AP-1 és IRF kompozit elemeket (AICE1 és AICE2), melyeket az IRF4/IRF8 és a ko-regulátor transzkripció faktorai kötőhelyeként, és a három félhelyet tartalmazó ISRE (TISRE) motívumot, melyet korábban az IRF1, IRF2 és IRF8 fehérjék kötőhelyeként azonosítottak. Az ISRE és TISRE motívumok az IRF3-domináns, az IRF9-domináns, valamint az IRF3-IRF9 klaszterekben dúsultak fel a legjobban. Az IRF-ekkel együtt aktivált faktorok motívumaival kapcsolatban a következő megfigyelést tettük. Az NFKB motívum az IRF3-domináns, az IRF5-domináns, valamint az IRF3-IRF5 klaszterben, míg a GAS motívum az IRF9 domináns klaszterben dúsult fel jelentősen. A TRE motívum az IRF3-domináns, a közös IRF3-IRF5 és IRF3-IRF9 klaszterekben, míg a CRE az IRF3-domináns, és közös IRF3-IRF5 klaszterekben fordult elő nagyobb gyakorisággal, mint a többi klaszterben.

A harmadik megközelítésünk során specifikus DNS-szekvenciák előfordulását vizsgáltuk. Először az ISRE-félhelyeket elemeztük. A 4 bázis hosszú ISRE-félhely (5'-GAAA-3') helyett 6 bázis hosszú szekvenciákat (6-mer) elemeztünk, mert az IRF-fehérjék kötődését az ISRE félhelyek 5' és 3' túlnyúló végükön található bázisok is befolyásolják. Készítettünk egy listát (n=535), amely tartalmazta az összes 5'-GAAA-3' ISRE félhely szekvenciát és két extra bázist három lehetséges pozícióban, egy bázis eltérést engedélyezve. Meghatároztuk ezen 6-mer szekvenciák gyakoriságát a klaszterekben. Sok olyan szekvenciát azonosítottunk (n=84), amelyek jelentősen feldúsultak valamelyik klaszterben, a legtöbbet (n=68) az IRF5-domináns klaszterben mutattuk ki. Ezekben általában az ISRE félhely harmadik bázisánál tértek el a kanonikus szekvenciától (például CGACAC és CGAGAC). A további elemzésekben olyan speciális ISRE variánsok (n=37) jelenlétét vizsgáltuk a klaszterekben, amelyeket korábbi tanulmányok vagy eredményeink alapján választottuk ki. Összesen 20 olyan ISRE variánst azonosítottunk, amelyek gyakrabban fordultak elő az IRF3-domináns klaszterekben, mint a másik két klaszterben. IRF9-domináns klaszterekben 4 ilyen ISRE variánst azonosítottunk, viszont nem találtunk olyan ISRE-variánsokat, amelyek gyakrabban fordultak volna elő az IRF5-domináns klaszterben, mint a másik két klaszterben. Összefoglalva a DNS motívumokkal kapcsolatos megfigyeléseinket: bizonyos ISRE motívumok és ISRE félhelyek nagyobb gyakorisággal fordultak elő egyes klaszterekben, ami arra utalt, hogy ezeket a szekvenciákat nagyobb affinitással köti vagy jobban tolerálja egy adott IRF a másik két IRF-hez képest.

Továbbiakban megvizsgáltuk a nyitott (hozzáférhető) kromatin régiókat ATAC-seq módszerrel stimulálatlan DC-kben. Az IRF klaszterek esetében jelentős különbséget detektáltunk abban, hogy a régiók mekkora aránya nyitott a stimulációt megelőzően. Az IRF3-, IRF5 és IRF9-domináns klaszterek közül az IRF5-

domináns klaszterekben találtuk a legtöbb nyitott kromatin régiót (62,4%), míg a két másik klaszterben 23,8% (IRF3-domináns) és 36,6% (IRF9-domináns) volt ezek aránya. Összességében megállapítottuk, hogy az ATAC-negatív régiók feldúsultak az IRF3- és IRF9-domináns régiókban, ami arra utal, hogy a „zárt”, nehezen hozzáférhető kromatin hozzájárul az IRF3- és IRF9-domináns (de nem a IRF5-domináns) kötőhelyek specifitásához, azáltal, hogy más IRF-ek kötődése számára ezek a helyek kedvezőtlenek. Megfigyeléseink összhangban álltak más transzkripció faktorokkal kapcsolatos eredményekkel, amelyek arra utaltak, hogy a kromatin állapota kulcsszerepet játszik a szelektív transzkripció válaszok kialakításában.

A gépi tanulási módszerek egyik alkalmazása az „osztálycímkék” predikciója bemeneti adatok alapján. A Random Forest segítségével megvizsgáltuk, hogy az IRF dominanciát milyen pontosan lehet prediktálni a kötőhelyek jellemzőinek felhasználásával. Páronkénti összehasonlítást végeztünk úgy, hogy a kötőhelyek klaszter neve (IRF3-, IRF5- vagy IRF9-domináns) szolgált „osztálycímkéként”. Bemeneti adatként DNS motívumok „erősségi” értékét, az ATAC-seq szignálértékeket, ISRE variánsok és 6-mer szekvenciák előfordulási értékeit alkalmaztuk, vagy ezek kombinációját használtuk. A predikció pontosságát a helyes és az összes predikció aránya alapján adtuk meg, a predikció helyes volt, amikor az eredeti és a prediktált osztálycímkék megegyeztek. Összességében az eredmények azt mutatták, hogy minden jellemző figyelembevételével az osztálycímkék nagy pontossággal (~80-85%) prediktálhatóak voltak, amikor az IRF5-domináns klasztert összehasonlítottuk a másik két domináns klaszterrel. Az osztálycímké prediktálása kevésbé volt pontos (~65%) az IRF3-domináns és az IRF9-domináns klaszterek összehasonlításakor. Ez azt jelenti, hogy az IRF5-domináns klaszter jelentősen különbözik a másik két klasztertől, míg a kötőhely jellemzői alapján az IRF3- és IRF9-domináns klaszterek kevésbé különböznek egymástól.

Az antivirális citokinek, a gyulladásos program génjei (citokinek és transzkripció faktorok), és az antivirális ISG-k szabályozásában kiemelt szerepet játszanak a különböző IRF-ek. Három génlistát állítottunk össze GO listák és a szakirodalom alapján. Az antivirális citokinek (n=25), a gyulladásos program génjei (n=119) és az antivirális ISG-k (n=63) transzkripció starthely (TSS) körül ± 10 kb méretű régióit (TSS ± 10 kb) meghatároztuk, majd azonosítottuk az ott található IRF kötőhelyeket. Ezután megvizsgáltuk az adott kötőhely típusát. Az antivirális citokinek TSS ± 10 kb régióiban az IRF3 domináns klaszter (és kisebb mértékben IRF3-IRF5 közös klaszter) mutatott feldúsulást. A gyulladásos programban részt vevő gének TSS ± 10 kb régióiban az IRF5-domináns és az IRF3-IRF5 közös klaszterek dúsultak fel, míg az antivirális ISG-k TSS ± 10 kb régióiban, az IRF9 domináns és az IRF3-IRF9 közös klaszterek fordultak elő leggyakrabban. ChIP-qPCR módszer segítségével megvizsgáltuk, hogy a TLR-ek között vagy a TLR és IFN útvonalak között kimutatható-e együttműködés vagy gátlás kombinált ligandkezelések esetén. Ezekben a kísérletekben a DC-ket egy agonistával, vagy azok kombinációival stimuláltuk. Megállapítottuk, hogy az IRF3 kötődését az antivirális citokinek IRF3 domináns régióihoz az összes kombinált kezelés gátolja. Az IRF5 kötődése a gyulladásos gének IRF5-domináns régióihoz nagyobb feldúsulást mutatott, amikor a pIC + CpG kombinált kezelést alkalmaztuk. Mivel az IRF5-t a TLR3 és a TLR9 agonista is aktiválta, a megnövekedett IRF5-kötődésének a két útvonal közötti együttműködés is lehet az oka. Végül, az IRF9 kötődése az antivirális ISG-k IRF9-domináns régióihoz hasonló volt, amikor az IFN β -t önmagában vagy CpG-vel kombinált kezelést alkalmaztuk, ami arra utal, hogy a TLR9 útvonal nem képes gátolni az IRF9 aktivációját vagy kötődését. Ezzel szemben a TLR3 útvonal gátolta az IRF9 aktivációját vagy kötődését az IRF9-domináns régiókba. Ezek az eredmények együttesen azt sugallják, hogy az IRF-ek és más transzkripció faktorok közötti verseny vagy együttműködés jelentősen befolyásolja az IRF3, IRF5 és IRF9 fehérjék kötődését.

Az IRF3, IRF5 és IRF9 kötőhelyekkel kapcsolatos vizsgálataink együttesen azt mutatták, hogy a DNS-motívumok, a kromatin nyitottsága, valamint az IRF-ek mellett aktivált más faktorok kötődése mind szerepet játszanak az IRF-specifikus válaszok létrehozásában. Ahogyan a gépi tanulási eljárás megmutatta, a három elemzett klaszter közül az IRF5-domináns klaszter alapvetően különbözött az IRF3- és IRF9-domináns klaszterektől. Az összes ISRE-variáns előfordulása ritka volt az IRF5-domináns klaszterben, viszont speciális ISRE félhelyek, mint például az 5'-GAGA-3' és az 5'-GACA-3', feldúsulása kimutatható volt. További vizsgálatokra van szükség annak feltárásához, hogy az IRF5 milyen módon kötődik ezekhez a speciális ISRE helyekhez. Az IRF3- és IRF9-domináns régiók jobban hasonlítottak egymáshoz, viszont ezeknél is azonosítottunk olyan jellegzetességeket, melyek egyik vagy másik klaszterben feldúsulást mutattak. Az IRF3-domináns klaszterben az NF κ B, AICE, TRE és CRE motívumok jelenléte arra utal, hogy ezekben a régiókhoz az IRF3 és egyéb TLR-aktivált faktorok kollaboratív módon kötődnek. Az IRF3-domináns régiókat az IRF9 nem köti nagy affinitással, valószínűleg azért, mert az NF- κ B és az AP-1 nem indukálódik az I-IFN útvonalon. Azt találtuk, hogy sok IRF9-domináns régió nemcsak ISRE hanem GAS motívumokat is tartalmazott. A GAS motívum feldúsulása arra utal, hogy az I-IFN jelátvitel által aktivált STAT1 homodimerek fontos meghatározói az IRF9-domináns kötődésnek. Vizsgálataink hozzájárulnak ahhoz, hogy megértsük, hogyan tudnak az IRF-ek specifikus helyekre kötődni, ami ahhoz szükséges, hogy a sejtekben ne indukáljanak felesleges vagy káros transzkripció programokat.

4. Az effektor ISG-k génszabályozó elemeinek vizsgálata

A második tanulmányunkban az effektor ISG-ek szabályozó elemeit elemeztük CD8⁺ DC-ben. Első lépésként RNA-seq módszerrel azonosítottuk azokat ISG-eket (n=1936), amelyek 6 órás IFN β -kezelés után legalább kétszeres indukciót mutattak. Az ISG-k listájából kiválasztottuk azokat a géneket (n=37), amelyeket

korábbi vizsgálatokban „antivirális effektorként” írtak le. RNA-seq segítségével meghatároztuk a TLR9 és TLR3 agonisták (CpG és pIC) hatását is. Eredményeink azt mutatták, hogy az IFN β általában hatékonyabb, mint a TLR agonisták. Sok effektor ISG-t viszont ezek az agonisták is képesek voltak indukálni, különösen 6 óra elteltével. Korábbi eredmények alapján igazolt, hogy az agonisták hatása részben indirekt, azaz az IFN β termelésén keresztül valósul meg. Néhány esetben azonban a TLR agonisták hatékonyabbak voltak, mint az IFN β , direkt hatásra utalva. Ilyen gének voltak CpG esetében az *Ifitm1*, *Gbp1* és *Gbp2*, a pIC esetében pedig a *Gbp2*, *Ifitm1*, *Gbp3*, *Ddx60*, *Gbp1* és *Ddx58*. Mivel elvégeztük a kombinált kezeléseket is, így vizsgálni tudtuk, hogy a szignálintegráció hogyan valósul meg az effektor ISG-k esetében. A NanoString nCounter technikával megmértük a kiválasztott effektor ISG-k és pro-inflammatorikus sejtek mRNS szintjét olyan DC-kben, amelyeket CpG, pIC vagy CpG + pIC ligandokkal stimuláltunk. Eredményeink azt mutatták, hogy míg a legtöbb gyulladásos citokin szintjét a két ligand additív vagy szinergista módon szabályozta, addig ilyen szabályozást az effektor ISG-nél nem tapasztaltunk, sőt sok esetben a CpG gátolta a domináns pIC hatását.

Ezt követően azonosítottuk az effektor ISG-ek szabályozó elemeit az IRF9 kötőhelyeinek feltérképezésével. Az elemzésünkhöz az IRF9 ChIP-seq adatainkat használtuk, illetve további ChIP-seq kísérleteket is végeztünk STAT1, STAT2, GCN5 kofaktor és RNS-polimeráz II (Pol-II) ellenes antitestek felhasználásával. Összesen 27 546 IRF9 kötőrégiót azonosítottunk IFN β -vel stimulált DC-kben (ezeknél mindkét replikában detektálható volt az IRF9 kötés). Ezek közül 78 olyan régiót azonosítottunk, amelyekhez egy effektor ISG-t rendelt a HOMER algoritmus legközelebbi génnek. A 78 kötő régióból 34 található a TSS-től 1 kb-on belül (TSS-proximális IRF9 kötőhelyek), míg 44 ettől nagyobb távolságra volt (TSS-disztális IRF9 kötőhelyek). Fontos megfigyelésünk volt, hogy a IRF9 szignálok nagyobbak voltak a TSS-proximális régiókban, mint a TSS-disztális régiókban. Az effektor ISG-k többsége ($n = 30$) olyan IRF9 kötőhellyel volt kapcsolatban, amely kevesebb, mint 1 kb-ra volt a TSS-től. Az effektor ISG-eket a kapcsolódó IRF9 csúcsok száma alapján osztályoztuk. A legtöbb effektor ISG ($n = 25$) egy vagy két IRF9 kötőhelyhez, míg 9 effektor ISG három vagy több IRF9 kötőhelyhez kapcsolódott.

Megvizsgáltuk az ISG-khez tartozó IRF9 kötőrégiókban a kanonikus ISRE (5'-GAAANNGAAA-3') szekvencia jelenlétét. Az ISRE szekvenciát az effektor ISG-khez tartozó 78 IRF9 kötőhely közül 43-ban azonosítottunk. Ez az előfordulási gyakoriság (55,1%) magasabb volt, mint más ISG-khez tartozó régiókban. Kiszámoltuk a tripla ISRE (TISRE) motívum előfordulási gyakoriságát is, és azt tapasztaltuk, hogy több mint háromszor gyakoribb volt az effektor ISG-khez tartozó IRF9-kötő régiókban más ISG-khez képest (29,5%, 78 kötőhelyből 23-ban).

A transzkripció faktorok és a kromatin nyitottsága kölcsönösen hatnak egymásra. Egyrészt, az aktivált transzkripció faktorok kötőhelyei általában már stimuláció előtt is nyitottak. Másrészt, kötődés után a transzkripció faktorok képesek „tovább nyitni” a kromatint, illetve esetenként zárt régiókat is képesek megnyitni. Korábbi vizsgálatok megmutatták több sejtípusban, hogy az ISGF3 képes a kromatin nyitottságát növelni, ezáltal közvetve fokozni a transzkripciót. Bizonyos kérdéseket azonban korábban nem vizsgáltak, ezeket a saját és más tanulmányok ATAC-seq eredményei segítségével igyekeztünk megválaszolni. Megvizsgáltuk, hogy milyen mértékben nyitottak az effektor ISG-k TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötőhelyei a stimuláció előtt DC-kben. Megállapítottuk, hogy az összes IRF9 kötőhelyek nagy része nyitott (ATAC-seq pozitív) volt a stimuláció előtt (69,0%), ami arra utalt, hogy más transzkripció faktorokhoz hasonlóan az ISGF3 is jelentős mértékben kötődik a már korábban is nyitott régiókhoz. Az „Immunological Genome Project” ATAC-seq adatait letöltve és újrakezelve megvizsgáltuk, hogy mennyire nyitottak az effektor ISG-k TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötőhelyei különböző immunsejtekben. A variációs együttható (CV) értékeit használtuk a sejtek közötti variancia számszerűsítésére. Azt találtuk, hogy egy adott effektor ISG TSS-proximális IRF9 kötőhelyeinél az ATAC szignál-értékek jellemzően kevésbé változtak, mint a TSS-disztális IRF9 szignál-értékek. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a TSS-disztális elemek jelentős számban sejt-specifikus módon működnek, bizonyos sejtekben aktívak, másokban zártak és kevésbé aktiválhatóak. Megvizsgáltuk továbbá, hogy az effektor ISG-k promóterei (TSS $\pm$ 1 kb) mennyire nyitottak más géncsoportok promótereihez (TSS $\pm$ 1 kb) viszonyítva. Ezekben az analízisekben két további génlistát, a háztartási gének ($n=31$) és a gyulladással kapcsolatos citokinek ($n=36$) listáját is elemeztük összehasonlításként. Az effektor ISG-knek a nyitottsági értéke (ATAC-szignál) hasonló volt az összes ISG nyitottsági értékéhez. A háztartási gének ATAC szignál-értékei magasabbak voltak, míg a CV értékek alacsonyabbak voltak, mint az effektor ISG-k vonatkozó értékei. Ezzel szemben gyulladással kapcsolatos citokinek ATAC szignál-értékei alacsonyabbak voltak, a CV értékek pedig magasabbak, mint az effektor ISG-k vonatkozó értékei. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az ISG-kre alapvetően jellemző, hogy nyitott a promóter régiójuk.

Az effektor ISG-ek szabályozóelemeivel kapcsolatos eredményeinket négy pontban foglaltuk össze. (1) Az elemzéseink azt mutatták, hogy az effektor ISG-k szabályozása nagyon változatos. Ez a változatosság megmutatkozik az I-IFN indukálta és stimulációt megelőző expressziós szintekben, az enhanszerek számában, a TLR3 vagy TLR9 agonisták általi indukálhatóságban, valamint az ISRE motívumokban. A heterogenitás miatt az összes effektor ISG-re jellemző tulajdonságok meghatározása nehéz vagy nem kivitelezhető. Azonban találtunk bizonyos jellemzőket, amelyek a legtöbb effektor ISG-re vagy a gének egy meghatározott részhalmazára jellemzőek voltak. (2) A legtöbb effektor ISG promóter régiója olyan ISGF3-kötőhelyet tartalmazott, amelyekre erős ISRE-motívum és nyitott kromatin jellemző. A DNS-szekvenciák mellett a genomiális régiók hozzáférhetősége kulcsfontosságú meghatározója az ISGF3-kötésnek. A kromatin nyitottsága stimuláció előtt jelentős mértékben meghatározza, hogy melyik régiókra képes az ISGF3 bekötődni. (3) Az effektor ISG-k kisebb részéhez (39 génből 9; 23,0%) két vagy több TSS-disztális szabályozó elem volt

rendelhető. A TSS-proximális és TSS-disztális IRF9 kötőhelyek különböztek. Az ISRE-k gyakorisága a TSS-disztális IRF9-kötő régiókban alacsonyabb volt, mint a TSS-proximális régiókban. A „gyengébb” ISRE-motívumok alacsonyabb IRF9 kötéssel jártak együtt. Ezenkívül a disztális IRF9 kötőhelyek nyitottsága inkább sejttípus-specifikus volt, mint a TSS-proximális helyek nyitottsága. Mivel az ISGF3 főként a már meglévő, hozzáférhető szabályozó régiókhoz kötődik, valószínűleg az ISGF3 különböző sejttípusokban különböző TSS-disztális szabályozó régiókhoz képes kötődni. (4) Bizonyos effektor ISG-k szabályozó régiói közvetlen TLR9 vagy TLR3 szabályozás alatt álltak. Ezek a gének (Gbp és Ifitm család) valószínűleg másféle immunválaszokban is kiemelt szerepet játszanak. Eredményeink összességében azt mutatták, hogy az erős ISRE motívumok és az univerzálisan nyitott promóter régiók fontos jellegzetességei a legtöbb effektor ISG-nek, amelyek robusztus, általánosan indukciót tesznek lehetővé. Ezen keresztül az I-es típusú IFN-indukált sejt-autonóm antivirális immunitás a legtöbb sejttípusban indukálható.

5. Az előzetes munkatervtől való eltérések és a nem publikált eredmények áttekintése

Az eredeti kutatási terv az alábbi főbb pontokat tartalmazta:

1. Korábbi RNA-seq adatok analízise;
2. Reprezentatív gének kiválasztása biológiai jelentőség és génexpressziós adatok alapján;
3. ELISA és áramlási citometriai mérések;
4. ChIP-seq kísérletek elvégzése;
5. Foszfoproteomikai vizsgálatok;
6. 4C kísérletek elvégzése és kiértékelése;
7. Kísérletek különböző vírus-fertőzött sejtekkel;
8. Primer CD8⁺ DC-vel végzett kísérletek különböző ligandokat használva;
9. Komplet adat elemzés, az adatok felhasználásával modellek alkotása;
10. Kéziratok elkészítése.

Ezeknek a vizsgálatoknak a legnagyobb része elkészült, bár nem szükségszerűen az eredeti ütemezés szerint. Egyedül a 4C kísérleteket nem végeztük el, mert publikációkhoz ezekre nem volt szükség. Ezen túl bizonyos tervezett ChIP-seq kísérletek nem készültek el, ha a korábban használt, megbízható antitest forgalmazása megszűnt (pl. p300, Santa Cruz Biotechnology, sc585). A bevezetőben ismertetett okok miatt az eredményeink egy része, vagy csak részben került bemutatásra (pl. RNA-seq és foszfoproteomika), vagy nem került be végül a publikációkba. Az utóbbiakra példák a proteomikai és a különböző vírus-fertőzött sejtekkel végzett kísérletek. A bevezetőben említettük, hogy míg mRNS szinten 271, addig fehérje szinten csak 25 gén mutatott szinergista szabályozást (RNA-seq és proteomikai adatok). A vírusokkal kapcsolatos eredményeink alapján a vírus-indukált válaszok nem voltak kifejezettebbek a TLR3 és TLR9 útvonalat együttesen aktiváló DNS vírusok esetében, mint a csak TLR3-t aktiváló +ssRNS vírusok esetében. A különböző vírusokkal fertőzött Vero vagy HeLa sejtekkel aktivált DC-k sejtfelszíni érési markerei (CD40, CD80, CD86) nem voltak magasabbak abban az esetben, ha DNA vírusokat használtunk (pl. HSV1 és ADV) szemben az +ssRNA vírusokkal (E71, HRV). Hasonlóképpen, az ELISA-val vizsgált citokinek (IL-12p40, IL-12p70 és IL-6) szintjei sem voltak magasabbak a DNS vírusok esetén, sem a primer DC-kben, sem a DC sejtvonalban. A kevert limfocita kultúra (Mixed Lymphocyte Culture, MLR) kísérletek szintén nem mutattak jelentős különbséget amikor a TLR9 ligandot egyedül vagy TLR3 liganddal együtt alkalmaztuk. A vizsgálathoz primer OT-I Tg egerekből izolált CD8⁺ T sejteket használtunk, DC-T sejt együtt tenyésztés után festék (eF506), perforin, vagy IFN γ szinteket mérve. Ezek alapján arra következtettünk, hogy a szignálintegráció fehérjeszinten és sejtválasz szintjén nem olyan kifejezett, mint azt a transzkripciós eredményeink alapján feltételeztük.

Az eredetileg tervezettekhez képest számos új RNA-seq kísérletet végeztünk el, nagyobb hangsúly került a ChIP-seq kísérletekre (az eredetinél több fehérje genomi kötőhelyét térképeztük fel), elvégeztünk korábban nem tervezett kísérleteket (pl. kromatin nyitottság ATAC-seq vizsgálatokkal), illetve szélesebb körű bioinformatikai elemzéseket végeztünk (pl. DNS motívum elemzések és machine learning). Összességében, a szignálok integrációjával kapcsolatos betervezett vizsgálataink képezték az alapját a megjelent publikációknak, több szignálintegrációval kapcsolatos eredményünk be is került a közleményeinkbe, viszont (az ismertetett okok miatt) a korábbi célkitűzéseinkhez képest a fő hangsúly az antivirális programokra és az IRF-ek vizsgálatára helyeződött.