

Ph.D. tézisek összefoglalója

**Magreceptorok szerepe a makrofágok
fejlődésében és funkciójában**

Dr. Szántó Attila

Témavezető: Dr. Nagy László

**Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet
Orvos- és Egészségtudományi Központ
Debreceni Egyetem
Debrecen, 2004**

Témavezető:

Dr. Nagy László

A vizsgabizottság elnöke:

A vizsgabizottság tagjai:

A védési bizottság elnöke:

Bírálok:

1. Bevezetés

1.1. Magreceptorok

1.1.1. Magreceptorok: Bevezetés

A magreceptorok ligandaktivált transzkripciós faktorok, amik fontos szerepet töltenek be a szövetek és szervek differenciációjában és számos alapvető anyagcserefolyamatot szabályoznak. Ezek a receptorok a receptor típusától függően vagy a sejtplazmában vagy a sejtmagban helyezkednek el és kis lipidmolekulák aktiválják őket, melyek származhatnak a sejten kívülről vagy keletkezhetnek a sejten belül. Ligandkötés után a receptorok meghatározott gének kifejeződését aktiválják. A magreceptorok egy nagy családot alkotnak, ide tartoznak pl. a klasszikus szteroid receptorok, a pajzsmirigyhormon receptor, a D vitamin receptor, a retinsav receptorok (RAR), receptorok, melyeket anyagcsere-termékek aktiválnak (pl. peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR), amit zsírsavak, liver X receptor (LXR), amit koleszterinszármazékok aktiválnak és jónéhány árva receptor. Az árva elnevezés abból származik, hogy ezeknek a receptoroknak nem volt ligandjuk a felfedezésük idején. Később számos vegyületet találtak, melyek aktiválták ezeket a receptorokat, de legtöbbjük alacsony affinitást mutatott. Ennek ellenére néhány árva receptort (pl. PPAR γ , LXR) adoptáltak azóta. A fehérjecsald tagjai közös, konzervált szerkezettel rendelkeznek: 1. DNS-kötő domén (DBD), ami egy specifikus DNS szekvenciához, a válaszadó elemhez kötődik, 2. ligandkötő domén (LBD), ami a kis lipidmolekulákat köti, 3. transzaktiváló domén, ami aktiválja a transzkripciós mechanizmusokat.

A magreceptorok többsége dimerként működik. A klasszikus magreceptorok, mint pl. az ösztrogén receptor, androgén receptor, glükokortikoid receptor homodimereket alkotnak. A nem-klasszikus magreceptorok, mint az RAR, VDR, TR a magban helyezkednek el a célgénjeik enhancerén és általában gátolják a transzkripciót. Ligandkötés hatására konformációs változás történik, ami a korepresszor komplex leválását és a koaktivátor komplex megkötődését eredményezi. A retinoid X receptor (RXR) sok más magreceptorral alkot dimert.

1.1.2. Magreceptorok: Retinoid receptorok

Az A vitamin és származékai, a retinoidok alapvető szerepet játszanak a fejlődésben, differenciálódásban, a homeosztázis fenntartásában és különféle anyagcserefolyamatokban. A retinoid receptorok felfedezése jelentősen hozzájárult ezen kis lipofil molekuláknak, a retinsavaknak hatásmechanizmusának a megértéséhez. A retinsavreceptorok két családja (RAR-ok és RXR-ek) 3-3 izotípust tartalmaz: α , β és γ , melyeket külön gének kódolnak és számos alternatív splice variánsal rendelkeznek. Az RAR-okat az all-transz retinsav (ATRA) és a 9-cisz retinsav (9-cisz RA), míg az RXR-eket csak a 9-cisz RA aktiválja. Az RAR-oknak szerepe van az embrionális fejlődésben, a vázrendszer, a mieloid sejtek fejlődésében, a sebgyógyulásban, a keratinizációban és az idegrendszer fejlődésében. Az RXR egy különleges receptor, ami homodimert és heterodimert is képes alkotni, ez utóbbi miatt hatása sokrétű, részt vesz a retinoid válaszokban és számos metabolikus folyamat szabályozásában is. Az RXR altípusok kifejeződése nem egyenletes: az $RXR\alpha$ főleg a májban, vesében, lépben, placentában, epidermiszben fejeződik ki, míg az $RXR\beta$ szinte minden szövetben megtalálható (akárcsak az $RAR\alpha$), az $RXR\gamma$ pedig főleg az agyra és az izomra korlátozódik.

1.1.3. Magreceptorok: PPAR-ok

A PPAR-ok több fontos anyagcserefolyamatot szabályoznak, melyeknek a zsírsav- és koleszterinanyagcserében van fontos szerepe. A családnak három tagja van: α , γ és δ . Az α leginkább barna zsírszövetben és májban, kisebb mértékben a vesében, szívben és vázizomban fejeződik ki. A $PPAR\gamma$ legnagyobb mértékben a zsírszövetben, a makrofágokban, kisebb mértékben a vastagbélben, az immunrendszerben és a retinában található. A $PPAR\delta$ sok szövetben jelen van, általánosan kifejeződik, legnagyobb szinten a bélben, vesében és a szívben. A PPAR-ok szerepére a célgénjeikből következtettek, melyek a lipidtranszporthoz és lipidanyagcseréhez kapcsolódnak. A $PPAR\gamma$ a sejben zajló folyamatok széles spektrumát regulálja, úgymint differenciálódás, sejtosztódás, sejtelhalás és gyulladás. Alapvetően szükséges a zsírszövet fejlődéséhez, kulcsszerepet játszik a glükózhomeosztázisban. Egérben elengedhetetlen a placenta fejlődéséhez és a vaszkularizációhoz. A $PPAR\gamma$ aktiválható természetes vegyületekkel, mint a zsírsavakkal, az oxidált LDL lipidalkotóival, a 11, 13-hydroxy ocatadecadienoic acid-del, a 15-deoxy-(12,14)PGJ2 (15D-PGJ2)-vel és a tiazolidindionokkal, melyeket mint

inzulinérzékenyítőket használnak a kettes típusú diabetes mellitusban. A PPAR γ knockout állat korai embriókorban elpusztul. A hiánya a trofoblasztok végső differenciálódását és a placenta vaszkularizációját zavarja és a miokardium elvékonyodásához továbbá az E10.0 napon halálhoz vezet. A PPAR γ gén hiánya makrofágokban nagy valószínűséggel proateroszklerotikus hatású.

1.1.4. Magreceptorok: Liver X receptor

Emlősökben két LXR létezik: α és β . Az LXR az RXR-rel alkot heterodimert, az α kifejeződése elég specifikus, leginkább a májban és kisebb, de jelentős szinten van jelen a makrofágokban, a vesében, a bélben, lépben és a mellékvesében. Az LXR β expresszója általánosabb, majdnem minden vizsgált szövetben előfordul. Oxiszterolokat, mint pl. a 22(R)-OH, 25-OH és 27-OH-koleszterol azonosítottak eddig, mint az LXR aktivátorait. Az LXR-nak szerepe van a koleszterol anyagcseréjében és kiürítésében és ahogy nemrégiben találták, gyulladásoz folyamatokban. LXR α deficiens egerek elvesztik azon képességüket, hogy normálisan reagáljanak az étkezési koleszterinre és képtelenek tolerálni minden extra koleszterinmennyiséget. Ezen egerek érlemeszednek.

1.2. Monociták-makrofágok

1.2.1. Monociták-makrofágok: Bevezetés

A monociták és a polimorfonukleáris fagociták CD34 pozitív pluripotens őssejtekből fejlődnek. Ezekből granulocita-monocita, granulocita és monocita kolóniaképző egységek (CFU-GM, CFU-G és CFU-M) keletkeznek. A monocita irányú differenciálódás a CFU-M-ből indul ki és monoblasztokon keresztül jönnek létre a keringő monociták, melyekből a különböző szövetekben alakulnak ki a szövetspecifikus makrofágok. Erre a fejlődési sorra jellemző markerek többek között az M-CSF receptor, lizozim, makroszialin, sejt felszíni fehérjék (pl. CD14, CD36, CD11b, CD18). A mieloid sejtek fejlődését főleg citokinek, illetve egy jól összehangolt, transzkripciós faktorokból álló hálózat befolyásolja. Az RAR egy ellenőrzőpontnál játszik szerepet ebben a fejlődési folyamatban, a promielocita lépésnél a granulocita irányú érést segíti elő. A retinsav citokinnel stimulált CD34 pozitív sejtekben a mieloid prekursorok érését eredményezi. A 15;17 kromozómatranszlokáció akut promielocitás leukémiához vezet egy PML-RAR α fúziós fehérje létrejötté miatt, ami a granulociták érésének terminális blokádjához vezet.

A PPAR γ -ról ismert, hogy befolyásolja a mieloid differenciálódást. Nem vesz részt a monocita irányvonal választásának szabályozásában, de módosítja a makrofágok érését és persze metabolikus folyamatait. A legújabb eredmények azt mutatják, hogy a PPAR γ nem feltétele a monocita irányú fejlődésnek, de a PPAR γ szintje és aktivitása kritikus a makrofágok sorsában és funkciójában. Hogy a PPAR γ hogyan befolyásolja az érést és van-e kapcsolata a retinoid receptorral az érési folyamatban, eddig még nem volt kellőképpen tanulmányozva.

1.2.2. Monociták-makrofágok: Lipid anyagcsere – Ateroszklerózis

Az érlemeszesedés az érfalak progresszív, degeneratív megbetegedése. Először lipidek halmozódnak fel az érfalban. A lézió kialakulása elkezdődik a születés után és a klinikai tünetek legtöbbször a hatodik évtizedben jelennek meg. Az érlemeszesedés komplikációi, a miokardiális infarktus, a stroke a nyugati társadalmak halálozásának jelentős részét teszik ki. Ez a tény különleges jelentőséget ad az érlemeszesedő lézió kialakulását célzó kutatásoknak. A makrofágok lipidanyagcsereje kiemelkedő fontosságú a hiperkoleszterolémia és az érlemeszesedő lézió kialakulása szempontjából. A léziók preferált helye az, ahol az endotélium sérülékeny. A nem megfelelő endotéliumkódés low-density lipoproteinek (LDL) felszaporodásához vezet a szubendoteliális térben. Nem ismert, hogy az LDL hogyan módosul, de a módosítás minimálisan és teljesen oxidált LDL megjelenéséhez vezet, melyek tele vannak oxidált lipid molekulákkal. A módosított LDL partikulák felvétele nem teljes, így azok befolyásolják a szomszédos sejtek működését, ami gyulladáshoz vezet. Így kialakul egy gyulladáshoz vezető válasz a felhalmozott lipid körül, ami további monocitákat vonz oda, melyek makrofággá alakulnak és lipidet halmoznak fel az oxLDL eltakarítása közben, így hozva létre a kezdeti lézió jellegzetes sejt típusát, a habos sejtet. Ezek megpróbálják eltakarítani a lipideket a szubendoteliális térből, de nem tudnak megszabadulni tőle, így folyamatosan halmozzák fel a lipidet és fenntartanak egy krónikus gyulladást. Utóbbi eredményeképpen a media felől simaizomsejtek vándorolnak a habos sejtek környékére, osztódnak és extracelluláris mátrixot termelnek. Így alakul ki a késői fibrózus ateroszklerotikus plakk. Ez már meszesedhet, ami rigiddé, törékennyé teszi az érfalat. Ha a lézió törése érinti az endotéliumot, az trombusképződéshez és intravaszkuláris koagulációhoz vezet. A PPAR γ -ról kimutatták, hogy elősegíti az oxLDL felvételét és a

monociták habos sejtekké való átalakulását. Szintetikus PPAR γ agonisták hasonlóan elősegítik a mielomonocitás leukémia sejtvonalak differenciálódását, és primer, human monocitákon is hasonló hatásúak. A PPAR γ kifejeződik az érlemeszesedő léziók habos sejtjeiben. Szintjét az oxLDL fokozza. Azt találták, hogy az oxLDL, de nem a sima LDL fokozta önmaga felvételét a CD36 scavenger receptoron keresztül. Ennek a jelenségnek a tanulmányozása során bebizonyosodott, hogy a PPAR γ alapvető szerepet játszik a habos sejtek lipidfelvételében. A CD36 scavenger receptor kifejeződését befolyásolja a PPAR γ , direkt célgénje a PPAR-nak. Az oxLDL két komponense, a 9-hidroxi oktadekadiénsav (9-HODE) és a 13-HODE mint endogén aktivátorok, ligandjai a PPAR γ -nak. Az oxLDL növeli a CD36 kifejeződését és ezáltal saját felvételét. A habos sejt kialakulásának fenti modellje szerint, amit gamma ciklusnak neveztek el, a PPAR γ a rossz oldalon áll és proaterikus molekulának tekintendő. Azonban a szintetikus PPAR γ aktivátorokat, a thiazolidinedione-okat (TZD) elterjedten használják a diabétesz kezelésében. Tehát a kérdés, hogy mi a szerepe a PPAR γ -nak az érlemeszesedésben még nincs megválaszolva. Érlemeszesedéses és/vagy cukorbetegnek előnyös vagy káros a PPAR γ aktiválása? Megfigyelték, hogy a PPAR γ aktiválása nemcsak a lipidek felvételét serkenti, hanem a koleszterinleadást is. A PPAR γ indukálja az ABCA1-et és a koleszterolleadást a makrofágokból egy transzkripciókaskádón keresztül, amit a PPAR γ és az LXR vezérelnek. Az ABCA1 és ABCG1 fehérjék az ATP-binding cassette transzporterek családjába tartozik. Számos tanulmány megmutatta, hogy az LXR az ABCA1 és ABCG1 indukálásán keresztül koleszterol kiáramlást okoz. A koleszterol kiáramlása a sejtekből nagy valószínűséggel antiateroszklerotikus hatású. Egy ellentmondás jön így létre, mivel az oxLDL potenciálva a saját felvételét, beindít egy ördögi kört. Hogy mindez hogyan lehetséges? Erre ad magyarázatot az a megfigyelés, miszerint a PPAR γ indukálja az LXR α -t. A lipid transzporterek, mint amilyen az ABCA1 promoterében pedig megtalálták az LXR válaszadó elemét. Így a PPAR γ nemcsak a lipidfelvételt fokozza, hanem az LXR α indukálásán keresztül növeli a lipidtranszporterek szintjét, pl. az ABCA1-ét, ami a koleszterol kiáramlás növekedéséhez vezet. A két receptor (PPAR γ és LXR) összekapcsolása egy használható modellnek tűnik, de nem ad magyarázatot a makrofág lipidfelvételének és koleszterinleadásának minden aspektusára. Hogy ez a két

folyamat hogyan kapcsolódik egymáshoz, nem ismert. Tehát a lipoproteinek lipidtartalma képes aktiválni mind a PPAR γ -t, mind az LXR-t. Azonban acetilált LDL hatására, ami nem tartalmaz oxidált lipideket szintén fokozódik az LXR útvonal aktivitása. Ez arra utal, hogy más, független mechanizmusok léteznek, melyek az LXR aktiválásához vezetnek. Az LXR PPAR γ általi indukciója önmagában nem elégséges, hogy aktív LXR jöjjön létre, ami koleszteroleadáshoz vezet. Szükséges az LXR saját, endogén liganddal való aktiválása, ilyen vegyületet azonban még nem írtak le. Ezek mellett az LXR-t már annak idején is úgy írták le, mint egy alternatív, retinoid szignál mediátort, mivel az LXR:RXR dimer nagyon permisszív akár az LXR oldalról oxiszterolokkal, akár az RXR felől retinoidokkal aktiválják. Számos oxiszterolt azonosítottak, mint potenciális LXR ligandot. Ezek egyike a 27-hidroxi-koleszterol, mely egy p450 enzimnek, a CYP27-nek a terméke. A CYP27 a májon kívül jelen van a tüdőben és makrofágokban is, illetve megtalálható atheroszklerotikus léziókban is. Az enzim mutációja egy ritka emberi megbetegedéshez a cerebrotendinózis xantomatózishoz (CTX) vezet. Ez egy szterol tárolási megbetegedés, xantomák figyelhetők meg az inakban, a központi idegrendszer területén, végül ataxia, gerincvelői bénulás, egyéb neurológiai diszfunkciók és érrelmeszesedés alakul ki. Az enzim terméke, a 27-hidroxi-koleszterol képes aktiválni az LXR-t. ezek az adatok felvetik, hogy talán a CYP27 az az enzim, ami ligandot generál az LXR számára.

2. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS MEGVÁLASZOLÁSRA VÁRÓ KÉRDÉSEK

A magreceptorokat sok oldalról tanulmányozták már a makrofágokban. A domináns receptorok a RAR-ok, RXR-ok PPAR (főleg a γ) és az LXR. Az RAR-ok fő funkciója a differenciálódásban van. Keveset tudni az RXR-ok funkciójáról. Funkcióját tekintve lehet kapcsolni az RAR-okhoz, PPAR-okhoz és LXR-okhoz, de vannak arra utaló jelek, hogy létezik önálló RXR szignálút is. Ez persze még további vizsgálatokat igényel. Az elmúlt évek eredményei alapján a PPAR γ kulcsfontosságúnak tűnik a makrofágokban. Szabályoz egy másik magreceptort, az LXR-t, vannak antiinflammatorikus hatásai és részt vesz az oxidált koleszterol eltakarításában. Sikerült azonosítani egy ciklust, ahol a PPAR γ pozitív visszacsatolással scavenger receptoron keresztül növeli a lipidek felvételét a makrofágokba illetve indukálja az LXR-t, ami a reverz koleszterol transzport aktiválásával segíti a koleszterol kiáramlást a sejtekből. Számos kérdés nincs azonban még megválaszolva. Ismert, hogy a PPAR γ aktiválása makrofág érési markerek megjelenését eredményezi, de önmaga nem szükséges a makrofág éréséhez. Ismert, hogy az RAR szabályozza a mielopoiesist. Van valamiféle kapcsolat a két receptor között? Mi az? A PPAR γ -t aktiválják az oxLDL-ből származó oxidált zsírsavak, de mi a helyzet az LXR-ral? Hogyan aktiválódik? Honnan származik a ligand, ami aktiválja? Az LXR:RXR heterodimer egy permisszív dimer. Mi a szerepe a retinoidoknak az LXR aktiválásában? Funkcionális szempontból a makrofágok heterogén populációt alkotnak. A makrofág aktiváltsági állapota befolyásolja a magreceptorok működését? Ha igen, akkor hogyan? Ezekre a kérdésekre kerestük a választ.

3. CÉLKITŰZÉSEK

Három lehetséges kapcsolatot akartunk részletesen megvizsgálni: 1. Az RAR-PPAR kapcsolat a mieloid érés során 2. a PPAR γ -LXR kapcsolat a makrofágok lipidmetabolizmusában 3. A PPAR γ válaszképesség és a makrofág aktívaltsági állapota közötti összefüggés.

1. RAR-PPAR kapcsolat

Mint azt már korábban említettük, az RAR egy átkapcsolási pontként szerepel a myeloid differenciálódás során, ahol granulocita irányba tolja el a sejteket. Azonban egy általánosabb szerepet találtak nemrég, mely szerint a mielopoiesis korai közös lépéseit szabályozza, melyek közősek a monopoiesisben és a granulopoiesisben. Meg akartuk vizsgálni a PPAR γ kifejeződését a fejlődés különböző állapotaiban és azt, hogy a retinoidok képesek-e az monocita irányú érést befolyásolni és/vagy a PPAR γ aktivitásra hatással vannak-e.

2. PPAR γ -LXR kapcsolat

A PPAR γ indukálja az LXR-t, de hogyan szabályozott az LXR aktivitása? Állandóan aktív lenne a nagyszámú endogén aktivátor jelenlétében vagy ennek hiányában szükséges egy endogén agonista létrejütte? Előzetes adataink arra utaltak, hogy ligand termelése szükséges az LXR aktiválásához. Arra voltunk kíváncsiak, hogy mindez hogyan történik és más magreceptorok, esetleg a PPAR γ képes-e ezt befolyásolni? Először azonosítottuk a hasonlóan szabályozott géneket a makrofágokban és összevetettük a PPAR γ által szabályozott génekkel. Ily módon, a globális expressziós vizsgálatokkal azonosítottunk potenciálisan érdekes jelölteket, és a továbbiakban azokat vizsgáltuk részletesen, melyek feltételezhetően képesek ligand generálására.

3. A makrofág aktívaltsága és a PPAR γ válaszkészség

Végül kíváncsiak voltunk, hogy mely makrofágokban működik a PPAR γ és az LXR. Az eddigi vizsgálatok soha nem célozták a makrofág oldaláról megközelíteni a magreceptorok működését. Monocitából makrofágot állítottunk elő, különféle citokinekkal, patogénekkel aktiváltuk a sejteket és összehasonlítottuk a magreceptorok kifejeződését és aktivitását a különböző állapotokban.

2. EREDMÉNYEK

2.1. A retinoidok fokozzák a PPAR γ választ a differenciálódás során, tekintettel a célgének expressziójára és lipidanyagcserére

2.1.1. A PPAR γ jelentősen változik a makrofág érése során

A PPAR γ a legjobban indukálódó magreceptor a mieloid sejtek érése során és a kifejeződése párhuzamosan változik a sejtek érettségével. Sőt, a PPAR γ aktiválása további differenciálódáshoz vezet a monocita irányban. Találtunk egy összfüggést a retinoid és PPAR útvonalak között: a retinoidok erősítik a PPAR γ válaszkészséget. Ez egy új összefüggés, ami lehetőséget adhat a PPAR γ regulálta folyamatok újfajta szabályozására.

Először összehasonlítottuk a PPAR α , γ és δ kifejeződését primer human CD34 pozitív sejtekben izolálás után és 8 napos M-CSF-fel való differenciáltatás után. Azt találtuk, hogy a PPAR γ szintje hétszeresére indukálódott, míg az α és a δ alig változott az érés során. Ehhez hasonlóan a monocita-makrofág átmenet során is a PPAR γ mutatja a legnagyobb változást (x27). A különböző érettségi állapotokat modellezendő sejtvonalakat választottunk: KG-1 akut mielogén leukémia, HL-60 akut promielocitás leukémia (FAB M3), THP-1 és MonoMac-6 (FAB M5) két monocitás leukémia sejtvonal. Korábbi vizsgálatok alapján a MonoMac-6 az érettebb. A legkevésbé érett KG-1-et kivéve mindben viszonylag magas szinten kifejeződnek a PPAR-ok, alacsonyabb a szintje a PPAR α -nak, a δ magasabb a két monocitás leukémia sejtvonalban, és a γ a legmagasabb szintet a MonoMac-6-ban mutatta, ami elérte a makrofágban mért szintet. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a makrofág irányú differenciálódást a PPAR γ , kisebb mértékben a δ indukciója kíséri. A retinoid receptorok szintjében nem volt nagy változás.

2.1.2. PPAR γ aktiválása monocita irányú éréshez vezet

A legkevésbé érett sejtvonal (KG-1) esetén a PPAR γ aktiválása nem okozott változást a sejtfelszíni markerben. A legérettebb MonoMac-6 sejtekben viszont nőtt a CD14, CD36 expressziója Rosiglitazone (PPAR γ) és LG268 (RXR) agonisták hatására. Megvizsgáltuk, vajon a retinoidoknak van-e hasonló hatása? Azt találtuk, hogy csak a kevésbé érett sejtek (KG-1 és HL-60) érését befolyásolta, mégpedig granulocita irányba. A monocita irányba

nem okozott változást. Azonban az RXR aktivátornak olyan hatása volt, mint a PPAR γ -nak, ami arra utal, hogy itt a PPAR γ :RXR dimeren hatnak az RXR agonisták.

2.1.3. A retinoidok potenciálják a PPAR γ választ

Meglepő módon, az RAR és PPAR γ aktivátorok egy nem várt szinergizmust mutattak. A sejteket előkezeltük retinoidokkal, hogy próbáljuk szimulálni a retinoidok hatását az érés korai fázisában, és csak ezután adtuk a PPAR γ agonistákat. Így, amikor a MonoMac-6 sejteket előkezeltük először RAR agonistákkal, majd ezután PPAR γ agonistával, jelentős emelkedést láttunk a PPAR γ agonista kiváltotta válasz nagyságában a CD14 és CD36 expresszióját mérve. Tovább vizsgálva ezt a jelenséget, megmértünk más PPAR γ célgént is: FABP4, CD36, ADRP, PGAR. A Rosiglitazone a következő mértékben indukálta ezeket a MonoMac-6 sejtekben: FABP4 (x42), CD36 (x5) and PGAR (x150) és a THP-1 sejtekben: FABP4 (x43) and PGAR (x3). A 9-cisz RA, AM580 hatása hasonló volt az ATRA-hoz, de a legnagyobb válaszfokozódást a 9-cisz RA és az AM580+LG268 kombinációnál kaptunk. Ez alapján egyértelmű, hogy ha vannak is különbségek, de általánosan elmondható, hogy a retinoidok mindkét sejt típusban, mind a négy vizsgált célgén esetében potenciórozták a PPAR γ agonista hatását. Ennek a jelenségnek egy jelentős részéért az RAR komponens a felelős.

Természetesen sok lehetséges magyarázat állhat a fenti jelenség mögött az epigenetikus szabályozástól a kofaktorokon át a PPAR γ szintjéig. Mi megnéztük a legnyilvánvalóbb lehetőséget, hogy a retinoidok nem indukálják-e a PPAR γ -t és azt találtuk, hogy természetes és szintetikus RAR agonisták indukálták a PPAR γ mRNS-t mindkét sejtvonalban, míg a PPAR α és δ nem változott. Végül megnéztük, hogy az oxLDL felvétele hogyan változik, ami egy lehetséges következménye a PPAR γ aktiválásnak és azt találtuk, hogy a retinoid előkezelés fokozta a Rosiglitazone hatására bekövetkező lipidfelvételt.

2.2. A humán CYP27 transzkripció szabályozása integrálja a retinoid, PPAR γ és LXR szignálutakat a makrofágban

2.2.1. Retinoidok és PPAR γ agonisták közvetlenül szabályozzák a humán CYP27 génjét

DNS chip elemzést végeztünk Rosiglitazone és LG268 kezelt MonoMac-6 sejteken és monocitából differenciáltatott makrofágokon. Azt találtuk, hogy a számos

lipidanyagcserében szereplő enzim között egy p450 enzim, a CYP27 is nagy mértékben indukálódott a monocita-makrofág átmenet során és a PPAR γ +RXR agonistával kezelt sejtekben. Ez felvetette a kérdést, hogy a PPAR γ , esetleg retinoidok nem szabályozzák-e ezen gének kifejeződését. Meghatároztuk a PPAR-ok, retinoid receptorok és az LXR mRNS szinteket a monocita-makrofág átmenet során és azt találtuk, hogy a PPAR γ és az LXR kifejeződése nagy mértékben növekedett. Érdekes módon ezzel párhuzamosan ugyanígy változott a CYP27 szintje is. Csak emlékeztetőül, a CYP27 terméke a 27-hidroxi-koleszterol, ami LXR aktiválásra képes. Ezek alapján úgy tűnik, érdemes megvizsgálni, hogy van-e közvetlenebb kapcsolat a CYP27 indukciója és a PPAR γ -LXR útvonalak között. Meg kívántuk határozni, hogy az egyes magreceptorok képesek-e a CYP27 szintjét befolyásolni.

2.2.2. RAR, RXR és PPAR γ indukálja a CYP27-et

Monocitából származó makrofágokat és egy monocitás leukémia sejtvonalat használtunk, hogy megnézzük az RAR, RXR, PPAR és LXR agonisták hatását a CYP27 expressziójára. A retinoidok és a PPAR γ aktivátorok növelték a CYP27 szintjét. RAR és RXR szelektív vegyületek egyaránt hatékonyak bizonyultak. A PPAR γ agonista Rosiglitazone szintén hatásos volt és LG268-cal kombinálva szinergista hatást kaptunk. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az RAR:RXR és a PPAR γ :RXR dimerek indukálják a CYP27 gént.

2.2.3. RAR:RXR és PPAR γ :RXR heterodimerek kötődnek és aktiválják a humán CYP27 gén promoterét

A CYP27 gén promoterét már korábban mások azonosították. Mi egy 853 bp-os darabbal végeztünk tranziens transzfekciókat, hogy megvizsgáljuk, az egyes heterodimerek képesek-e aktiválni a promotert. Az RAR és RXR kotranszfektálása és 9-cisz RA-val megkezelve egy több mint 5-szörös indukciót kaptunk. Ehhez hasonlóan a PPAR γ és RXR kotranszfektálásakor és a megfelelő ligandokkal szintén megnövekedett promoteraktivitást tudtunk detektálni. Ezek az adatok arra utalnak, hogy ebben a 853 bp-os darabban megvan minden szükséges információ a retinoid és PPAR γ regulációhoz. Hogy megtaláljuk a válaszadó elemeket, változó hosszúságú deléciós mutánsokat elemeztünk és azt kaptuk, hogy egy rövidebb 649 bp-os promoterdarabban az indukciók

kb. a felére csökkentek, míg egy 217 bp-os darabban teljesen eltűntek. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy lehet egynél több elem van a promoterben. In silico elemzéssel két régiót definiáltunk. Ezeket elneveztük PRRE (PPAR-RAR Response Element) A-nak és B-nek. Az A elem 3 szokatlan elrendezésű kötőhelyet tartalmazott egy átfedő hellyel DR1-DR5 helyzetben. A B elem egyszerűbbnek tűnt egy DR1 kötőhellyel.

2.2.4. A válaszadó elem karakterizálása

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) kísérleteket végeztünk annak eldöntésére, hogy a talált válaszadó elem valóban képes-e kötni a receptorokat. A hCYP-PRRE-B egyaránt köti a RAR:RXR és a PPAR γ :RXR dimert. A specificitást tovább erősítette, hogy az egyik vagy a másik receptor elleni specifikus antitestekkel sikerült a kötést megszüntetni vagy supershiftet létrehozni. VP16-receptor fúziós receptorokat transzfektáltunk CV-1 sejtekbe. Ezek konstitutívan aktív receptorok és ha képesek a válaszadó elemhez kötődni, mérhető a receptor gén aktivitása. Erős kötést kaptunk mind a 3 receptorral. Annak eldöntésére, hogy az azonosított válaszadó elem funkcionális enhancer-e, enhancer trap vektorokat hoztunk létre, amiben az azonosított válaszadó elem két kópiája volt jelen egy TK promoter és luciferáz génjétől upstream. Hasonló kísérleteket a másik elemmel is elvégeztük és ezek alapján a B elem tűnik kritikusnak a válaszok mediálásában és egy jóval szerényebb szerepe van az A elemnek.

2.2.5. CYP27 expresszió növeli a 27-hidroxikoleszterol szintjét és az effluxot

Tömegspektrométerrel meghatároztuk a CYP27 termékeinek, a 27-hidroxikoleszterolnak és a 3 β -hidroxi-5-koleszténsavnak a szintjét a sejtekben illetve a médiumban. Az ATRA, 9-cisz RA, AM580, LG268 és a Rosiglitazone+LG268 mind növelte a termékek szintjét úgy a sejteken belül, mint a médiumban.

2.2.6. A 27-hidroxikoleszterol aktiválja az LXR-t és indukálja annak célgénjeit

A 27-hidroxikoleszterol nagymértékű szinergizmust mutat az RXR agonistákkal. Míg önmaga 10mM-os koncentrációban 14-szeres indukcióra képes, addig 9-cisz RA-val egy további 19-szeres növekedést, összesen tehát egy 300-szoros növekedést kaptunk. Tehát a 27-hidroxikoleszterol egy parciális agonista, ami ha egyszer létrejön, retinoidokkal hatalmas LXR válasz kiváltására képes.

2.2.7. A retinoidok a CYP27 indukálásával LXR választ váltanak ki

A retinoidok és az LXR agonisták indukálják az LXR célgéneket, mint pl. az ABCA1, ABCG1. az RXR agonisták és a panagonista retinoidok hatása könnyen magyarázható az RXR aktiválásával. Az RAR szelektív vegyületek, mint pl. az AM580 hatása nem ez. Feletételztük, hogy a CYP27 indukcióján és a következményes 27-hidroxikoleszterol termelődésen keresztül hatnak. Hogy ezt bebizonyítsuk, CYP27 null sejteket használtunk, amiket cerebrotendinózis xantomatózisos betegekből nyertek és nem volt bennük funkcionális CYP27. RAR agonistával sikerült megmutatnunk, hogy a retinoid indukálta LXR válasz hiányzik a betegek sejteiből, míg az egészséges kontrollokéban kiváltható.

2.2.8. A retinoid-PPAR γ -CYP27-LXR szignálút jelen van humán ateroszklerotikus lézióban

Humán makrofágban gazdag ateroszklerotikus lézióból izoláltunk RNS-t és megmértük a fent részletezett útvonal egyes elemeinek kifejeződését. Azt találtuk, hogy szemben az ép érfallal a lézió sejteiben sokkal magasabb a PPAR γ , CYP27 és LXR és célgénjeik, a CD36, ABCA1 szintje. Ez arra utal, hogy ez az útvonal aktív a lézióban.

2.3. A PPAR γ válaszkészség a különbözően aktivált makrofágokban

2.3.1. A PPAR γ magasan expresszálódik az alternatívan aktivált makrofágokban

Ahogy a monociták belépnek a szubendoteliális térbe, átalakulnak makrofággá és az extracelluláris szignálok hatására aktiválódnak, hogy betöltsék feladatukat. Két alapvető formája van az aktivált makrofágoknak: a klasszikusan aktivált sejtek gyulladásos ágensek és citokinek hatására alakulnak ki és az eredmény egy gyulladásos sejt, létezik ezenkívül egy alternatív aktiválás is, melyről korábban úgy gondolták, hogy egy gátló, antiinflammatorikus folyamat, leginkább interleukin-4 (IL-4) hatására jön létre. Azóta egy sor pozitív funkciót is kötöttek az alternatívan aktivált makrofágokhoz: antigénprezentálás, a gyulladás felszámolása, a szöveti törmelék eltakarítása, fagocitózis. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a makrofág aktiváltsági állapota hogyan befolyásolja, hogyan korrelál a PPAR γ expressziójával és funkciójával. Ezért in vitro aktiváltuk a makrofágokat: IFN γ és TNF α kombinációjával klasszikusan és IL4-gyel alternatívan. Az aktiváltsági állapot befolyásolja a PPAR γ szintjét, a többi PPAR szintje nem változik. Az IL4 indukálja a PPAR γ -t. Még nagyobb a különbség a PPAR γ válaszkészségében. A PPAR γ célgének eltérően indukálódnak a különböző aktiváltságú sejtekben. A célgének

szinte csak az alternatívan aktivált makrofágokban illetve minimálisan a nem aktivált sejtekben indukálhatók, de nem a klasszikusan aktivált sejtekben. Mindez nem magyarázható a PPAR γ eltérő szintjeivel, ennek megmagyarázása további vizsgálatokat igényel. A PPAR γ expressziót és válaszkészséget megvizsgáltuk egér makrofágokon is. Használtunk rezidens preitoneális, tioglikolát-elicitált peritoneális és csontvelőből differenciáltatott makrofágokat. Ezek a sejtek különböznek a humán sejtektől, de a PPAR γ expresszióját tekintve mégis hasonlóak ahhoz. DNS chip vizsgálatokat végeztünk a humán mintákból, hogy meghatározzuk, a PPAR γ válaszképességben adódó különbség mennyire általános jelenség vagy csak a gének egy szűkebb csoportjára igaz. Azt találtuk, hogy több gén indukálódik az alternatívan aktivált sejtekben, sőt nemcsak a gének száma volt több, hanem a kifejeződés mértéke is jóval magasabb volt az IL4 kezelt sejtekben. Érdekes megfigyelés volt, hogy szinte alig volt olyan gén, ami két állapotban is indukálódott és egyáltalán nem volt olyan, ami mindhárom állapotban növekedést mutatott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a PPAR γ és az alternatív makrofág aktiváltság összefügg és a PPAR γ funkciói az alternatív makrofágok funkcióihoz kötődnek.

3. DISZKUSSZIÓ

3.1. Retinoid-PPAR kapcsolat

Azóta, hogy a PPAR γ -t kimutatták a mieloid sejtekben még nem sikerült megtalálni, mi is a szerepe. Jónéhány tanulmány szerint szerepet játszik a sejtek érésében.

Szisztematikus elemzés eddig nem történt. Tanulmányoztuk a PPAR γ kifejeződését normál és leukémiás sejtekben. Azt találtuk, hogy a PPAR γ szintje összefügg a sejtek érettségével. A differenciálódás során nő a PPAR γ szintje. A PPAR γ aktiválása növeli a monocita markerek kifejeződését. Szintén megmutattuk, hogy a retinoidok fokozzák a PPAR γ átíródását és a célgénjei kifejeződését. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a RAR-nak egy kezdeti szerepe lehet a monocita irányú fejlődésben és képes a PPAR γ válaszkészség fokozására. A PPAR γ számos más fejlődési folyamatban részt vesz, pl. a trofoblaszt, placenta vaszkularizációjában, a zsírfejlődésben. A PPAR γ null ES sejtekből sikerült makrofágot differenciáltatni in vitro. A PPAR γ -nak specifikus szerepe van a lipidadyagsre szabályozásában, mind a felvételt, mind a leadást regulálja. A PPAR γ hiány a makrofágokban proateroszklerotikus. A PPAR γ válaszkészségének megértése kritikus az érlelmeszedés megismerése szempontjából és a terápia szempontjából sem.

3.2. Retinoid-PPAR γ -LXR kapcsolat

Tanulmányoztunk egy p450 enzimet, a CYP27-et, ami egyrészt indukálódik a monocita-makrofág átmenet során, másrészt a PPAR γ :RXR és a RAR:RXR is szabályozza. A promoteranálízis azt mutatta, hogy a gén complex szabályozás alatt áll a fenti receptorok által. Ezzel egy kapcsolat vált ismertté természetes vegyületek között, mint a retinsavak, oxidált zsírsavak és oxidált koleszterol között. Ezek együttesen szabályozzák a lipídáramlást a makrofágon keresztül, eltakarítva a lipideket a lézió helyéről a reverz koleszterol transzport és egy alternatív útvonal segítségével. A korábbi vizsgálatokban szintetikus vegyületeket használtak, melyek a folyamatok vizsgálatához hasznosak, de nem mondanak semmit arról, hogy a valóságban, az endogén ligandok által hogyan is játszódhatnak le ugyanezek a folyamatok. Másrészt a szintetikus anyagok, mivel erős agonisták a jóval gyengébb sokszor parciális természetes aktivátorokhoz képest jelentősen eltérhetnek. Másrészt ezekkel szuperfiziológiás receptoraktiválást is el lehet

érni. Ezek miatt a természetes ligandok keletkezése, annak a szabályozása sokkal többet árul el a receptor valódi funkciójáról. Nagyon kevés magreceptor esetén ismert, hogy a ligand hogyan keletkezik. Pl. az LXR esetén is jónéhány vegyületet ismernek, melyek képesek a receptor aktiválására, de hogy ezek közül melyik lehet endogén ligand, még nem ismert. Ilyen pl. a 22(R)-koleszterol, 20(S)-koleszterol, 24-, 25- és 27-hidroxikoleszterol. Ezek gyenge aktivátorok, érdekes módon a keringésben legnagyobb mennyiségben a 27-hidroxikoleszterol van jelen. Mi megmutattuk, hogy magreceptorok szabályozzák a CYP27-nek a kifejeződését, egy új szabályzási lehetőséget vet fel. Továbbá az RXR aktivátorokkal való nagy szinergizmus is érdekes mechanizmust rejt és felértékeli az RXR szerepét. A 27-hidroxikoleszterol egy poláris vegyület, ami képes a membránon átjutni, ezáltal egy alternatív koleszterol effluxot valósít meg, és hozzájárul a reverz koleszterol transzportozhoz. A CYP27-en komplex szabályozások konvergálnak. A transzkripcióját az RAR, az RXR és a PPAR γ egyaránt befolyásolja, a promoteren levő válaszadó elemhez szintén kétféle heterodimer képes kötődni. Nem egy hanem egy erősebb és egy gyengébb válaszadó elemet tartalmaz. Érdekes, hogy míg a fenti folyamatokat emberben figyeltük meg, az eger makrofágjaiban ez a szabályozás nem létezik. Ez magyarázhatja a CYP27 knockout állat és a mutációt hordozó betegek közti különbségeket. Véleményünk szerint a retinoidregulált CYP27 az LXR válaszok modulátora. A megismert szabályozás új beavatkozási lehetőséget is nyújt a habos sejtek kialakulásába és az érlelőszesedés megelőzésében. Természetesen további vizsgálatok szükségesek annak eldöntéséhez, hogy felhasználható-e a CYP27 szabályozás, és ha igen hogyan?

3.3. PPAR γ - makrofág aktiválás

A makrofágok a szövetekben alakulnak ki a monocitákból és aktiválódnak. A klasszikus aktiválás gyulladás hatására pl. Toll-like receptorok közvetítésével történik meg, gyulladáshoz vezető citokinen termelésével, Th1 domináns immunválasszal. Ezzel szemben az alternatív aktiválás inkább gátló, védő szerepet tölt be, a gyulladás utáni eltakarításban és rendbehozatalban van szerepe és Th2 immunválasszal jár. Magreceptorokat összefüggésbe hozták már korábban a makrofágok immunológiai funkcióival. Mi arra voltunk kíváncsiak, hogy a fenn bemutatott receptorok hogyan változnak és az aktivitásuk hogyan változik az eltérően aktivált makrofágokban.

Emberi monocitából készített makrofágokat és egér peritoneális, csontvelői eredetű makrofágokat használtunk. Azt találtuk, hogy a PPAR γ rendkívül gyorsan indukálódik a monocita-makrofág átmenet során, ehhez jön egy második indukció az IL4 által. Mindkét indukció átmeneti, idővel csökken. Ezenkívül egy további csökkenést találtunk a klasszikus aktiválás során. Még érdekesebb különbség van a PPAR γ aktiválhatóságában. Leginkább az alternatívan aktivált sejtekben működik, sokkal kevésbé a nem aktivált sejtekben és szinte alig a klasszikus aktivált makrofágokban. Nemcsak a regulált gének számában, hanem a mértékében is van különbség. Ez arra utal, hogy a PPAR γ aktivitása az alternatívan aktivált sejtekre jellemző.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A magreceptorok ligand aktiválta magreceptorok, melyek sokféleképpen befolyásolják a soksejtűek életét. In vivo a funkcionális magreceptorhoz szükség van természetesen a receptorra, mint fehérjére, endogén ligandra, ami aktiválja azt és a sejt megfelelő körülményeire. Ez utóbbihoz tartozik többek között a koaktivátor complex egyes elemeinek a jelenlétére és a regulált DNS szakasz permisszív epigenetikus állapotára. A magreceptorokról már korábban kiderült, hogy fontos szabályozói a makrofágok lipidanyagcseréjének és esetleg fejlődésének. A PPAR γ a fő komponense a lipidfelvétel szabályozásának: a CD36 scavenger receptor indukálásával növeli az oxLDL felvételét. A RAR-ról ismert, hogy fontos szerepe van a mieloid sejtek differenciálódásában.

- Találtunk egy kapcsolatot e két receptor között. Megmutattuk, hogy a PPAR γ szintje nő az érettség mértékével. A PPAR γ aktiválása növeli a makrofág markerek kifejeződését (pl. CD14, CD36). Érdekes módon a retinoidok potenciálják a PPAR γ válaszkészségét.

A koleszterolfelvétel és leadás alapvető fontosságú a makrofág működése és az érlelmeszesedés szempontjából. A PPAR γ és az LXR részt vesz a fentiek szabályozásában.

- Találtunk egy kapcsolatot a retinoid, PPAR γ és LXR között: egy p450 enzimet, a CYP27-et. Megmutattuk, hogy az enzim complex szabályozás alatt áll a retinoidok és a PPAR γ aktivátorok által. Az enzim indukciója növeli a termék, a 27-hidroxikoleszterol termelődését, ami végül aktiválja az LXR-t és beindítja az LXR által szabályozott folyamatokat, így a koleszterol leadást. Makrofágban gazdag meszesedő lézióban kimutattuk a fenti útvonal elemeit, melyek szintje emelkedett az ép érfalhoz képest. A CYP27 kapcsolatot teremt a retinoid, a PPAR γ és az LXR között.
- Szintén megvizsgáltuk a makrofág különböző aktiváltsági állapotát. A PPAR γ főleg az alternatívan aktivált makrofágokra jellemző és a célgénnek is szinte csak ott indukálódnak.

A DISSZERTÁCIÓHOZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint LB, Furtos I, Rühl R, Molnar C, Csiba L, Garuti R, Calandra S, Larsson H, Diczfalusy U, Nagy L: Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, PPAR and LXR signaling in macrophages.

Mol. Cell. Biol. (2004) 24: 8154-8166 (IF:8.142)

Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray, IP, Davies, PJA, Nagy, L: Retinoid X receptors: a non-conventional target of biological discovery and pharmacological intervention.

(Review)

Cell Death Differ. (in press) (IF:7.008)

Szanto A, Nagy L,: Retinoids potentiate PPAR-gamma action in differentiation, gene expression and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. *Mol.*

Pharmacology (in revision)

Szanto A, Nagy L: Macrophage activation determines PPAR-gamma responsiveness.

(before submission)

Ahuja HS, **Szanto A**, Nagy L, Davies PJ: The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death. (Review)

J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2003 Jan-Mar; 17(1): 29-45 (IF:0.747)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Szanto A, Nagy L: Lipid sensors in atherosclerosis – nuclear hormone receptors in disease progression. (Review)

B.I.F. Futura (Boehringer Ingelheim Funds) 17:129-136 (2002)

Balint LB, **Szanto A**, Madi A, Gabor P, Benko, S, Puskas LG, Davies PJA, Nagy L: Arginine methylation provides epigenetic transcription memory for retinoid-induced differentiation in myeloid cells.

Mol. Cell. Biol. (in revision)

POSZTEREK

Szondy Z, Oliviero S, Lecoeur H, **Szanto A**, Gougeon ML, Piacentini M, Fesus L: Tissue transglutaminase may be responsible for induction a caspase independent cell death in U937 cells.

6th International Conference on Transglutaminase and Protein Crosslinking. Lyon, France, 16-19 September 2000

Szanto A, Paragh Gy, Töröcsik D, Nagy L: Interactions between PPAR-gamma and retinoic acid receptor (RAR) pathways during the differentiation of a myelomonocytic cell line (in Hungarian)

9th Cell Biology Days. Debrecen, Hungary, 21-24 January 2001

A Szanto and L Nagy: Interaction between PPAR gamma and retinoic acid receptor (RAR) pathways during the differentiation of monocytic leukemia cells.

EMBO Workshop on Nuclear Receptor Structure and Function. Erice, Italy, 12-15 May 2001

A Szanto and L Nagy: Interaction between PPAR gamma and retinoic acid receptor (RAR) pathways during the differentiation of monocytic leukemia cells.

Annual Meeting of the Hungarian Society of Biochemistry. Sáropatak, Hungary 14-17 May 2001

A Szanto and L Nagy: Interaction between PPAR gamma and retinoic acid receptor (RAR) pathways during the differentiation of monocytic leukemia cells.

11th International Workshop. Beyond the Identification of Transcribed Sequences: Functional Expression and Evolutionary Analysis. Reston, Virginia 9-12 November 2001

A Szanto and Laszlo Nagy: Interaction of PPAR-gamma and retinoic acid receptor (RAR) pathways during the differentiation of monocytic leukemia cells. A transcriptional

cascade regulates differentiation and lipid metabolism in myeloid cells.

Nuclear Receptor Superfamily – Keystone Symposia. Snowbird, Utah 13-19 April 2002

A Szanto and Laszlo Nagy: Interaction of PPAR-gamma and retinoic acid receptor (RAR) pathways during the differentiation of monocytic leukemia cells. A transcriptional cascade regulates differentiation and lipid metabolism in myeloid cells.

Annual Meeting of the Hungarian Society of Biochemistry. Keszthely, Hungary 14-17 May 2002

A Szanto, R Garuti, S. Calandra, U. Diczfalusy, L Nagy: Dual role for retinoids in the activation of liver X receptor mediated metabolic pathways in macrophages.

Regulatory and Effector Functions of Macrophages – Keystone Symposia, Taos, New Mexico, Jan. 30-Febr. 4, 2003

A Szanto, R. Garuti, S. Calandra, U. diczfalusy, L. Nagy: Retinoids regulate the activation of PPAR-gamma and LXR regulated metabolic pathways in macrophages. PPARs: Transcriptional Regulators of Metabolism and Metabolic Disease – Keystone Symposia, Keystone, Colorado, Febr. 4-9, 2003

A Szanto, L Nagy: Role of nuclear receptors in differently activated macrophages. Nuclear receptors: Orphan Brothers, Steroid Sisters – Keystone Symposia, Keystone, Colorado, Febr. 28-March 4, 2004

A Szanto, L. Nagy: Role of PPAR-gamma in the differently activated macrophages. 18th Conference of European Macrophage and Dendritic Cell Society, Barcelona, Spain, October 14-16, 2004