

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**EGYES NOD-LIKE RECEPTOROK ÉS KÖLCSÖNHATÓ PARTNEREIK
EXPRESSZIÓJA ÉS MODULÁCIÓJA MAKROFÁGOKBAN ÉS KORNEÁLIS
EPITÉL SEJTEKBEN**

Varga Aliz

Témavezető: Dr. Benkő Szilvia



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2014

**EGYES NOD-LIKE RECEPTOROK ÉS KÖLCSÖNHATÓ PARTNEREIK
EXPRESSZIÓJA ÉS MODULÁCIÓJA MAKROFÁGOKBAN ÉS KORNEÁLIS
EPITÉL SEJTEKBEN**

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

Írta: Varga Aliz
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Benkő Szilvia, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Kacs Kovics Imre, az MTA doktora
Dr. Szabó Judit, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

DE ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, 3.506.
2014. november 6. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora
Dr. Jeney Viktória, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora
Dr. Kacs Kovics Imre, az MTA doktora
Dr. Jeney Viktória, PhD
Dr. Szabó Judit, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

DE ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2014. november 6. 13:00 óra

1. Bevezetés

1. rész

A Nod-like receptorok (NLR-ek) intracelluláris mintázat felismerő receptorok (PRR-ek), melyek fontos szerepet játszanak az immunválasz szabályozásában. Az NLRP3 az NLR családba tartozó legjobban tanulmányozott olyan fehérje, mely képes multiprotein komplexek kialakítására. Ezek a komplexek az ún. inflammoszómák. Az NLRP3 inflammoszóma aktivációját különböző patogén – vagy „danger”- asszociált molekuláris mintázatok (PAMP, DAMP) válthatják ki. Ez a sokféle mintázat valószínűleg nem közvetlenül aktiválja az NLRP3 inflammoszómát. Feltételezések szerint a legtöbb NLRP3 inflammoszóma aktivátor reaktív oxigéngyök (ROS) termelést vált ki, mely fontos szerepet játszik az inflammoszóma aktivációját eredményező jelátviteli folyamatokban. Az NLRP3 inflammoszóma aktivációjának eredményeként IL-1 β citokin termelődik, melynek szerepe ismert számos betegség kórlefolrásában. Ilyen betegség pl allergiás rhinitis, melynek legfőbb okozója a parlagfű pollen. A parlagfű pollen szemek, illetve az azokból nyert kivonat NADPH oxidáz aktivitással rendelkezik, mely ROS termelésre képes. Munkánk során a parlagfű pollen hatását vizsgáltuk az NLRP3 inflammoszóma működésére illetve az IL-1 β termelésre lipopoliszacharid (LPS)-aktivált makrofág sejteken.

2. rész

A korneális epitél sejtek fontos szerepet játszanak a szem immunológiai védelmének biztosításában passzív fizikai barrierként, illetve aktív citokin és kemokin termelő sejtekként egyaránt. Vizsgálataink idején az NLR család tagjainak korneális epitél sejtekben való expressziójáról egyetlen publikáció sem állt rendelkezésre. Ezért célul tűztük ki, hogy elsőként mutassuk be az NLR-ek és az inflammoszómát alkotó fehérjék mRNS expresszióját primer humán korneális epitél sejtekben és sejtvonalban (HCE-T). Célul tűztük ki továbbá az UV-B sugárzás – mint a szemet érő egyik leggyakoribb környezeti stressz faktor – hatásának vizsgálatát az NLR-ek kifejeződésére. Ezen kívül egy olyan sejtvonalat kerestünk, mely jó modellként szolgálhat az NLR család tagjainak tanulmányozására korneális epitél sejtekben.

2. Irodalmi háttér

2.1 Mintázat felismerő receptorok

A természetes (veleszületett) immunrendszer első védelmi vonalként biztosítja az ún. “vész-szignálok gyors érzékelését, valamint fontos szerepe van az adaptív immunválasz beindításában. A vész-szignálokat a PRR-ek ismerik fel, melyek közül megkülönböztethetünk sejt felszíni, intracelluláris, valamint szekretált receptorokat is.

2.1.1. Szolubilis mintázat felismerő receptorok

A szolubilis PRR-ek olyan receptorok, melyeket az őket expresszáló sejtek szekretálnak. Ilyen PRR-ek pl. a komplement receptorok és a pentraxinok.

2.1.2. Membrán-kötött mintázat felismerő receptorok

A PRR-ek számos tagja fizikai kapcsolatban marad az őket expresszáló sejttel. Ezek a PRR-ek vagy sejt felszínhez kötöttek, vagy endoszómális kompartmentekben helyezkednek el.

a, Toll-like receptorok

A Toll-like receptorok (TLR-ek) a természetes immunitás kulcsfontosságú szenzorai, melyek számos patogén- eredetű molekuláris mintázat felismerésére képesek. Ilyen mintázatok pl. a glikolipidek, proteinek és a nukleinsavak. A TLR-ek leginkább immun-sejteken expresszálódnak, de nem immun-sejteken is kimutatták már a jelenlétüket. A TLR1, 2, 4, 5 és 6 a sejt felszínen, míg a TLR3, 7, 8 és 9 a citoszólon belül elhelyezkedő endoszómákban található.

b, Dektinek

A Dektinek leggyakrabban makrofágokban és dendritikus sejtekben expresszálódnak. A Dektin-1 a β -glükánok, míg a Dektin-2 az α -mannánok felismerésére képes.

2.1.3. Intracelluláris mintázat felismerő receptorok

Az intracelluláris mintázat felismerő receptorok alapvető szerepet játszanak nem csak az intracelluláris, de az extracelluláris vész-szignálok felismerésében is egyaránt. Ide tartoznak a Nod-like receptorokon kívül a RIG-like helikázok. A RIG-I helikáz doménje révén a RIG-like helikázok közé tartozik. Caspase recruitment domain (CARD) doménje nélkülözhetetlen a

dsRNS által elindított jelátvitel szabályozásában. A RIG-like helikázok másik tagja az MDA5, mely szintén a virális RNS felismerésére specializálódott receptor.

2.2. Nod-like receptorok

Közel 15 évvel ezelőtt egy új, hármas tagolású domén szerkezettel rendelkező intracelluláris PRR családot írtak le. A C-terminális leucinban-gazdag szekvencia (LRR) biztosítja a vész-szignál érzékelését. A centrálisan elhelyezkedő nukleotid-kötő domén (NBD) az oligomerizációért és az aktivációért felelős. Az N-terminális effektor domén típusa alapján az NLR család tagjai alcsoportokba sorolhatók, mint pl. a pirin domént (PYD) tartalmazó NLRP, illetve a CARD domént vagy az eddig még nem definiált domént tartalmazó NLRC alcsoportok.

2.2.1. NLRC alcsoport

a, NOD1, NOD2

A NOD1 az iE-DAP dipeptid és a Tri-DAP érzékelésére képes, melyek minden Gram-negatív és néhány Gram-pozitív baktérium sejtfalában megtalálható peptidoglikán (PGN) alkotói. A NOD2 az MDP-t érzékeli, mely a baktériumok minimális bioaktív PGN mintázata. Aktivációjuk során az NBD oligomerizációja elindítja a RIP2 adaptor proteinhez kötődés folyamatát a CARD domén segítségével. Ezt a komplexet néhány közleményben NODoszómának is nevezik. A NODoszóma összeállása után a RIP2 fontos szerepet játszik az NF κ B, MAPK, ERK és JNK jelátviteli útvonalak aktivációjában, mely többek között a proinflammatorikus citokinek expressziójának fokozódásához vezet.

b, NLRC5, NLRX

Az NLR család legnagyobb méretű tagja az NLRC5, mely egy citoszólikus protein, de aktivációt követően képes a citoszól és a nukleusz között „vándorolni”. Az NLRC5 funkcióját illetően ellentmondásos eredményeket találhatunk az irodalomban. Ismert, hogy az NLRC5 expressziója IFN γ -val jelentősen, míg a TLR-ligand LPS-sel mérsékeltebben indukálható.

Az NLRX1 szintén az NLRC alcsoportba tartozó protein. Az NLRC5-höz hasonlóan az NLRX1 szerepe is ellentmondásos jelenleg az eddig megjelent közlemények alapján.

2.2.2. Inflammoszómák

Aktivációjuk során a NLR család több tagja és néhány nem NLR családba tartozó fehérje képes multiprotein komplexeket, ún. inflammoszómákat kialakítani, melyekben szenzor funkciót töltenek be. Az inflammoszómák a szenzorból, ASC adaptor proteinből és kaszpáz-1 effektor enzimből épülnek fel. A pro-kaspáz-1-ből lehasadó aktív kaszpáz-1 az éretlen pro-IL-1 β -t és pro-IL-18-at érett citokinekké képes hasítani. Az inflammoszóma szenzorának típusa alapján különböző inflammoszóma komplexeket különböztethetünk meg.

a, NLRP1 inflammoszómák

Az NLRP1 egy 1473 aminosavból álló fehérje, mely az N-terminális PYD doménon kívül egy CARD domént is tartalmaz C-terminálisan. Az NLRP1 inflammoszóma emberben az NLRP1 szenzorból, kaszpáz-1 és kaszpáz-5 enzimekből és az ASC adaptor fehérjéből áll. Az anthrax letális toxin az egyik legfontosabb NLRP1-ligand. Ismert, hogy az NLRP1 gén polimorfizmusai összefüggésben állnak autoimmun betegségekkel, melyekben az inflammoszóma kóros aktivitását mutatták ki.

b, NLRP2 inflammoszómák

Az NLRP2 1062 aminosavból áll, mely PYD domént, NBD domént és 8 LRR-t tartalmaz. Bár az NLRP2 az NLR család egyik legrégebben ismert tagja, pontos élettani szerepe még mindig nem tisztázott. Ismert azonban, hogy különböző proinflammatorikus stimulusok hatására az NLRP2 gátolja az NF κ B aktivációt.

c, NLRP6 inflammoszómák

Az NLRP6 egy 892 aminosavból álló fehérje, mely PYD domént, centrális NBD domént és legalább 5 LRR-t tartalmaz. Kimutatták, hogy az NLRP6-nak fontos szerepe van az intesztinális homeosztázis fenntartásában.

d, NLRP7 inflammoszómák

Az NLRP7 980 aminosavból épül fel. A PYD doménon és az NBD doménon kívül 9 LRR-t tartalmaz. Egyes irodalmi adatok az NLRP7 inflammoszóma aktivátor szerepét, mások az NLRP7 IL-1 β szekrécióját gátló működését írják le. Kimutatták, hogy az NLRP7 gén mutációi összefüggésben állnak a *Hydatidiform mole* nevű ritka, autoszomális recesszív betegséggel.

e, NLRP12 inflammoszómák

Az NLRP12 egy 1061 aminosavból álló fehérje, mely PYD domént, centrális NBD domént és legalább 12 LRR motívumot tartalmaz. A fehérjének mind inflammatórikus, mind antiinflammatórikus szerepét leírták már. Az azonban ismert, hogy az NLRP12 fontos szerepet játszik az intesztinális homeosztázis fenntartásában. Kimutatták azt is, hogy az NLRP12 mutációi összefüggésben állnak gyulladásoos betegségekkel, pl. az atópiás dermatitisszel.

f, NLRC4 inflammoszómák

Az NLRC4 az NLR család NLRC alcsaládjába tartozik. Az NLRP fehérjékkel ellentétben közvetlenül képes kötődni a pro-kaspáz-1-hez CARD-CARD kölcsönhatáson keresztül. Az NLRC4 bizonyított szerepe a kaspáz-1 aktiválása bakteriális flagellin hatására.

g, AIM2 inflammaszómák

Bár az AIM2 szerkezetileg különbözik az NLR fehérjéktől, intracelluláris PRR-ként funkcionálva inflammoszómák kialakítására képes. Az AIM2 inflammoszómában az AIM2 HIN200 doménje a bekebelezett apoptotikus sejtekből származó citoszólikus DNS-hez képes kötődni, PYD doménje pedig az ASC-hez kötődv a kaspáz-1 aktiválásához, következésképpen a pro-IL-1 β és a pro-IL-18 aktív citokinekké hasításához vezet.

2.3 NLRP3 inflammoszómák

Az NLRP3 egy 1036 aminosavból álló fehérje, mely PYD domént, NBD domént és 9 LRR-t tartalmaz. Az NLRP3 inflammoszómák az NLRP3 szenzor molekulából, az ASC adaptorból és a kaspáz-1 effektor enzimből épülnek fel. Az NLRP3 „gain of function” mutációi, az NLRP3 inflammoszóma nem megfelelően szabályozott aktivációja kórosan növekedett IL-1 β szekrécióhoz vezethetnek és összefüggésben állnak számos betegséggel. Ilyen betegségek pl. különböző krónikus gyulladásoos, autoinflammatórikus, valamint metabolikus betegségek, továbbá a rák kialakulására való hajlam. Ezért rendkívül fontos az NLRP3 inflammoszóma aktivációjának megfelelő szabályozása.

2.3.1. Az IL-1 β expresszió szabályozása az NLRP3 inflammoszóma aktivációján keresztül

2.3.1.1. Az IL-1 β , mint proinflammatorikus citokin

Az IL-1 β 31 kDa molekulatömegű inaktív prekurzorként (pro-IL-1 β) szintetizálódik, majd enzimatikus hasítással válik 17 kDa molekulatömegű érett citokinné. A legtöbb szekretált fehérjével ellentétben a pro-IL-1 β nem tartalmaz hidrofób „leader” szekvenciát és nem a klasszikus szekretórikus útvonal organellumaiban szállítódik. Markáns proinflammatorikus hatással rendelkezik, és fontos szerepe van számos gyulladással járó állapotban, mint pl. az autoinflammatorikus és allergiás betegségek. Az IL-1 β citokint főként monociták, makrofágok és dendritikus sejtek termelik.

2.3.1.2. Az NLRP3 inflammoszóma aktivációja és az IL-1 β termelés szabályozása

A jelenlegi dogma szerint az IL-1 β termeléshez két szignál szükséges. Az első szignál (általában TLR aktiváció) az NF κ B útvonal által mediált folyamatok eredményeként a pro-IL-1 β (és az inflammoszóma tagok) expresszióját biztosítja. A legtöbb NLRP3 inflammoszómát aktiváló PAMP az első szignál elindításához szükséges. A második szignál, mely döntően DAMP-ok által keletkezik, az inflammoszóma komplex összeállásához, a kaszpáz-1 aktivációjához, ennek következtében pedig az IL-1 β érésehez szükséges. Kimutatták, hogy a második szignál gyakran ROS termelés, endoszómális membrán károsodások, az intracelluláris és az extracelluláris tér kalcium koncentrációjának különbsége, valamint kálium kiáramlás következménye.

2.4. A reaktív oxigén gyökök szerepe az NLRP3 inflammoszóma aktiválásában

Az elmúlt néhány évben olyan kutatási eredmények láttak napvilágot, melyek szerint a legtöbb NLRP3 aktiváló ágens ROS termelést is képes kiváltani, a termelt ROS pedig fontos szerepet játszik az inflammoszóma aktivációhoz vezető jelátviteli folyamatokban. Kimutatták, hogy oxidatív stressz során a tioredoxin (TRX)-interakciós protein (TXNIP) közvetlenül képes az NLRP3 inflammoszóma aktiválására. A TXNIP a sejt normál állapotában kölcsönhat a TRX-szel, így nem tudja aktiválni az NLRP3 fehérjét. Oxidatív stressz során viszont a TXNIP felszabadul az oxidált TRX-ről és az NLRP3-hoz közvetlenül kötődve elindítja az inflammoszóma „összeszerelődésének” folyamatát. A legtöbb NLRP3 inflammoszóma aktivátor ROS-szenzitív módon indukálja a TXNIP disszociációját a TRX-ről, elősegítve annak az NLRP3-hoz való kötődését.

2.4.1. Antioxidánsok

Amikor a ROS termelésének és semlegesítésének finom egyensúlya felborul, oxidatív stressz alakul ki. Az egyik legismertebb antioxidáns az általános „ROS-scavenger” funkcióval bíró N-acetil-cisztein (NAC). A mitokondriális ROS inhibitorokként számon tartott antioxidánsok közül a MitoTempo az egyik legismertebb. A difenilén-jodónium (DPI) széles körben használt NADPH oxidáz inhibitor, mely ugyanakkor képes gátolni a mitokondriális ROS termelést is.

2.4.2. A ROS és az NLRP3 inflammoszóma szerepe az allergiás rhinitisben és asztmában

Az allergiás rhinitis legfőbb kiváltója a parlagfű pollen. A parlagfű pollen szemek illetve az azokból kinyerhető parlagfű pollen kivonat NADPH oxidázokat tartalmaz. A pollen szemek belélegzésüket követően ROS termelést váltanak ki a légutak epitél sejtjeiben. Az így felszabaduló ROS az allergiás rhinitisben szenvedő betegek tüneteit súlyosbítja.

Az NLRP3 inflammoszóma szerepe az allergiás légúti betegségekben eddig kevésbé ismert és ellentmondásos. Egy közleményben azt írták le, hogy az NLRP3 inflammoszómának nincs szerepe a háziporátka által kiváltott allergiás légúti megbetegedések kialakulásában. Egy másik kutatócsoport szerint az allergiás rhinitisben szenvedő betegek pollen szezon idején kisebb mértékben expresszálják az NLRP3 mRNS-t a nem allergiásokhoz képest. Ezekkel ellentétben mások azt írták le, hogy az allergiás légúti gyulladással járó állapotok kialakulása NLRP3 inflammoszóma-függő. Nemrégiben kimutatták, hogy a városi levegőben lévő káros anyagok is növelik a ROS termelést a tüdőben, ezzel súlyosbítják az allergiás asztma tüneteit. A légutak epitél sejtjeiben funkcionális NLRP3 inflammoszómák vannak, melyek a szennyező anyagok hatására a kaspáz-1 működése révén érett IL-1 β -t termelnek.

2.5. Makrofágok

A makrofágok kulcsszerepet töltenek be mind a természetes, mint az adaptív immunválaszban, melynek során gyors és hatékony védelmet nyújtanak a „vész-szignálok” –t elindító mikroorganizmusok ellen. A „vész-szignálok”-at PRR-ekkel érzékelik, mint pl. a TLR-ek és az NLR-ek. Tschopp és munkatársai fedezték fel a funkcionális inflammoszómát, mely elsőként THP-1 makrofák sejtjeiben írták le. Az inflammoszómák működésének nem megfelelő szabályozása makrofágokban káros IL-1 β szekrécióhoz vezethet, mely összefüggésbe hozható számos betegséggel, mint pl. a krónikus gyulladással járó állapotok, autoimmunitás, és a rákra való hajlam.

2.6. Korneális epitél sejtek

A kornea immunrendszerének legfőbb sejtjei a korneális epitél sejtek. Passzív fizikai barrierként, valamint aktív citokin, kemokin és antimikrobiális peptid termelő sejtekként vesznek részt a patogénekkal szembeni védelemben. A korneális epitél sejtek is expresszálnak PRR-eket a patogének, illetve a környezeti káros faktorok felismerésére (UV-sugárzás). Vizsgálataink idején a TLR-ek korneális epitél sejtekben való expressziójáról állt rendelkezésre néhány irodalmi adat, azonban az NLR-ek és az inflammoszóma kifejeződése ekkor még ismeretlen volt ezekben a sejtekben.

2.7. Célkitűzések

- A parlagfű pollen kivonat hatásának vizsgálata a nem kezelt illetve LPS-aktivált humán makrofág sejtek IL-1 β termelésére.
- A ROS szerepének vizsgálata a parlagfű pollen kivonattal és/vagy LPS-sel kezelt makrofágok IL-1 β termelésére.
- Az NLRP3 inflammoszóma szerepének vizsgálata az LPS-aktivált és parlagfű pollen kivonattal makrofágok IL-1 β szekréciójában.
- Annak kiderítése, hogy mely jelátviteli útvonalak vesznek részt a parlagfű pollen kivonattal és/vagy LPS-sel kezelt makrofágok IL-1 β termelésére.
- Megfelelő humán korneális epitél sejt vonalat találni, mely jó modellként szolgálhat a korneális epitél sejteken végzett NLR tanulmányainkhoz a primer sejtek helyett.
- Az NLR-ek expressziójának vizsgálata humán korneális epitél sejtekben.
- Az UV-B sugárzás hatásának vizsgálata az NLR-ek expressziójára korneális epitél sejtekben.

3. Metodikák

3.1. THP-1 makrofág sejt kultúra

A THP-1 monocita sejt vonalat (ATCC TIB-202) Prof. Nagy Lászlótól kaptuk. A sejteket 10% hőinaktivált FCS, penicillin-sztreptomycin és L-glutamin tartalmú RPMI 1640 (Gibco) tápoldatban, 37°C-on 5% CO₂ tartalmú közegben tenyésztettük. A sejteket tenyésztő edényekben 0.5 μM forbol mirisztát acetát (PMA, Invivogen) jelenlétében differenciáltattuk 3 órán keresztül, majd 3x mostuk PBS-ben és újra tenyésztőedényekbe tettük 5x10⁵ sejt/ml sűrűségben ELISA mérésekhez, 10⁶ cells/ml sűrűségben valós idejű kvantitatív polimeráz-lánreakcióhoz (Q-PCR) illetve Western blot-hoz. A sejteket éjszakán át hagytuk letapadni, majd kezeltük 100 ng/ml ultratiszta LPS-sel (InvivoGen), 10 μg/ml parlagfű pollen kivonattal (Greer Laboratories, 100 μM NADPH (Sigma-Aldrich) vagy 0.3 mM H₂O₂-dal (Sigma-Aldrich). A pollen kivonat endotoxin tartalma 16.31 pg/g, mely elhanyagolható az általunk alkalmazott LPS koncentrációhoz képest. Az N-acetil-cisztein (NAC, 30 mM, Sigma-Aldrich), MitoTEMPO [2-(2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2 oxoethyl] triphenylphosphonium chloride monohydrate) (300 μM, Santa Cruz Biotechnology), difenilén-jodónium (DPI, 10 μM, Sigma-Aldrich) és a kaszpáz-1 inhibitor (Z-YVAD-fmk, 20 μM, BioVison) 1 órával a kezelések előtt adtuk a sejtekhez.

3.2. Makrofág és dendritikus sejt differenciáció

A humán vérkészítményeket a Regionális Vérellátó Központ bocsátotta rendelkezésünkre az Országos Vérellátó Szolgálat igazgatójának, valamint a Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság jóváhagyásával. Minden vérvétel a donorok előzetes írásos beleegyezésével történt, azok adatainak feldolgozása és megőrzése az Orvos Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat etikai irányelvei szerint történt. A CD14⁺ monocitákat anti-CD14-konjugált mikrogyöngyökkel szeparáltuk (VarioMACS Separation System; Miltenyi Biotec) az egészséges donorok leukocita-dúsított vérkészítményeiből, majd 10% FCS, 500 U/ml penicillin-sztreptomycin (Life Technologies), és 2 mM L-glutamin (Life Technologies) tartalmú RPMI 1640 tápoldatban, tenyésztőedényekben tartottuk. A sejtsűrűség 12 lyukú tenyésztőedényben 1.5 × 10⁶ sejt/ml. A makrofágok és dendritikus sejtek (DC) differenciációjához 80 ng/ml GM-CSF-et (Leucomax; Gentaur Molecular Products) vagy 80 ng/ml GM-CSF-et és 100 ng/ml IL-4-et (PeproTech) alkalmaztunk. A 3. napon az IL-4-et és a GM-CSF-et újra a sejtekhez adtuk. A sejteket az 5. napon 24 óráig kezeltük 500 ng/ml LPS, 100 μg/ml RWE és 100 μM NADPH jelenlétében.

3.3. Korneális epítél sejt kultúra

Az SV-40-immortalizált humán korneális epítél sejt vonalat (HCE-T) Kaoru Araki-Sasaki-tól (Osaka University, School of Medicine, Osaka, Japan) kaptuk a Riken Cell Bank-on keresztül. A primer humán korneális epítél sejteket egészséges donorok szeméből, fotorefraktív keratektómiás (PRK) beavatkozás során nyertük. A sejteket 200 U/ml penicillin-sztreptomycin, 5% FCS (Gibco, San Diego, CA), 5% glutamin, 5 µg/ml inzulin, 0.5% dimetil szulfoxid (mind: Sigma-Aldrich, St Louis, MO), és 10 ng/ml humán epidermális növekedési faktor (Invitrogen) tartalmú DMEM/F12 tápoldatban tenyésztettük. A peptidoglikán kezeléshez 4 µg/ml szolubilis, szonikált, *Escherichia coli* K12-ből származó ultratiszta peptidoglikánt (PGN-ECndss; Invivogen) használtunk.

3.4. A sejtek életképességének vizsgálata

A THP-1 sejtek életképességét LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen) segítségével vizsgáltuk. A PMA-kezelt THP-1 sejteket éjszakán át hagytuk letapadni 96 lyukú tenyésztőedényben, majd kezeltük 100 ng/ml LPS-sel, 10 µg/ml RWE-vel és 100 µM NADPH-val DPI vagy NAC jelenlétében és hiányában. 24 óra kezelés után a sejteket PBS-ben mostuk, majd 45 percig inkubáltuk Live/Dead Viability/Cytotoxicity Solution jelenlétében. A kalcein acetoximetil (Calcein AM)-jelölt egészséges sejtek zöld, míg a nem élő sejtek sejt magjait jelölő etídium homodimer-1 (EthD-1) piros fluoreszcens jelet adnak. A fluoreszcenciát BioTek spektrofotométerrel, megfelelő excitációs és emissziós filterek használatával mértük.

HCE-T sejtek esetében UV-B-kezelést követően MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) kolorimetriás módszerrel vizsgáltuk a sejtek életképességét.

3.5. A HCE-T sejtek Ultraviolet-B kezelése

A körülbelül 85%–90% konfluenciájú HCE-T sejteket a felülúszó eltávolítása után 30 mJ/cm² UV-B dózissal sugaraztuk FG15T8 lámpa használatával. A kezelés után a sejteket saját tápoldatukban inkubáltuk, 6 illetve 24 óra elteltével összegyűjtöttük. A kontroll sejteket a besugarozás kivételével azonos módon inkubáltuk.

3.6. Reaktív oxogényök mérés

10⁶ THP-1 sejtet töltöttünk fel 50 M 2'-7'-dihidro-diklorofluorescein diacetáttal (H2DCFDA, Invitrogen) 37 °C-on 20 percig, majd a megfelelő kezeléseket elvégeztük. Az inkubációs idő eltelté után a sejteket összegyűjtöttük és FACSCalibur (Becton Dickinson)

áramlási citométerrel mértük a fluorszcens jelet. Az adatok kiértékelése FlowJo szoftver használatával történt.

3.7. siRNS transzfekció

A differenciáltatott THP-1 sejteket 2.5 μM NLRP3-specifikus vagy nem specifikus negatív kontroll „scrambled” siRNS (Silencer Select Pre-Designed and Validated, Ambion) jelenlétében elektroporáltuk, majd tenyésztőedényre tettük. 48 óra inkubáció után a sejteket 24 óráig kezeltük, ezt követően a felülúszókat ELISA mérésre, a sejteket pedig Q-PCR és/vagy Western blot vizsgálatokra összegyűjtöttük.

3.8. RNS izolálás és RT-PCR

A totál RNS izolálását TriReagent (Molecular Research Center) használatával végeztük a gyártó utasításai szerint. Az RNS koncentrációkat és a homogenitást spektrofotométerrel (NanoDrop ND1000; Promega Biosciences) mértük. Ezt követően adott mennyiségű RNS-t emésztettünk DNáz (Ambion) segítségével, majd a reverz transzkripciót Super Script II RNáz H – Reverz Transzkriptáz és Random Primerek (Invitrogen) jelenlétében végeztük.

3.9. Valós idejű kvantitatív PCR (Q-PCR)

A Q-PCR technikához a mintákat 96 vagy 384 lyukú optikai reakció „plate”-eken, ABI Prism 7900HT Sequence Detector System (Applied Biosystems) műszerben futtattuk. A reakciókhoz a gén-specifikus oligo mixeket az Applied Biosystems-től vásároltuk. Taq DNS Polimerázt (Fermentas) használtunk az amplifikációhoz és Rox referencia festéket (Invitrogen) a fluorezcens reporter jel normalizálásához. A reakcióelegyek 25 vagy 12,5 μl végtérfogatban 125 ng cDNS-t tartalmaztak. A kapott eredményeket a Sequence Detector System 2.1 verziójú szoftverével (Applied Biosystems) értékeltük ki. Az expressziós szinteket ΔCt módszerrel számoltuk ki és ciklofilin vagy 36B4 háztartási génekre normalizáltuk.

3.10. Western blot analízis

A nem kezelt és kezelt sejteket jéghideg PBS-ben mostuk, majd lízis pufferben szuszpendáltuk. A lízis puffer összetétele: 30 mM Tris (pH 7.6), 140 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 2 mM Na-pirofoszfát, 50 μM fenilazin-oxid, 1% Triton-X and 1 mM Na_3VO_4 , frissen hozzáadott proteáz inhibitorok (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 mM PMSF). A minták összfehérje koncentrációját BCA protein assay reagent kit (Pierce) segítségével határoztuk meg. 30 μg totál fehérjét az SDS mintafelvivő

pufferrel (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, glicerol, 10% SDS, 0.025% brómfenolkék) együtt 10 percig 100 °C-on inkubáltuk. Az így kapott lizátumokat SDS-PAGE gélen szeparáltuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk nedves elektro-blottolással. A membránokat 5% zsírszegény tejport tartalmazó Tween-TBS-ben blokkoltuk, majd NLRP3 és NLRP1 (Alexis Biochemicals), hasított IL-1 β és kaszpáz-1 (Cell Signaling Technology), pro-kaspáz-1 (Santa Cruz Biotechnology), foszfo-p38 MAPK, foszfo-SAPK/JNK (Cell Signaling Biotechnology), foszfo-p38 és p38, foszfo-SAPK/JNK és SAPK/JNK, foszfo-c-Jun (Ser63 és Ser73) és c-Jun, foszfo-c-Fos és c-Fos, p-I κ B- α (Santa Cruz Biotechnology vagy Cell Signaling Biotechnology) specifikus antitestekkel jelöltük éjszakán át 4 °C-on. Az elsődleges antitesteket HRP-konjugált másodlagos antitestek segítségével detektáltuk (Amersham) 1 óráig szobahőn. A fehérjéket Supersignal West-Pico peroxide/luminol enhancer solution (Pierce) segítségével tettük láthatóvá. A vizsgált fehérjék egyenlő mennyiségét a β -aktin (Sigma-Aldrich) expressziójának kimutatásával erősítettük meg.

3.11. Kaspáz-1 aktivitás mérés

A kaszpáz-1 enzim aktivitás a sejtek lizátumából történt acetilált, AMC-konjugált fluorimetrikus peptid szubsztrát Acetyl-Tyr-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl-coumarin (Anaspec) segítségével. A sejtek lízisét jégen végeztük 30 perces inkubációval 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % NP-40, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 0.5 μ g/ml pepstatin, 1.25 μ g/ml leupeptin és 1 mM DTT összetételű pufferben. Centrifugálás (10000 g, 10 min 4 °C) után 30 μ g fehérje lizátum felülúszóját 100 μ l lízis pufferben 40 μ M szubsztráttal (végső koncentráció) inkubáltuk mikrotiter plate-en szobahőn. Az AMC felszabadulásából származó megnövekedett fluoreszcenciát 460 nm-en, 355 nm excitációs hullámhosszon detektáltuk Wallac 1420 Victor2 fluorimeter-luminometer (Wallac Oy) segítségével.

3.12. A szekretált citokin koncentráció meghatározása

A szekretált citokin koncentráció meghatározása a kezelési idők eltelte után a sejtek felülúszóiból történt ELISA módszerrel a gyártó cégek instrukciói alapján. IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 és IL-12-specifikus (BD Biosciences), valamint IL-18-specifikus (R&D System) ELISA Kit-eket használtunk. A detektálhatósági határ az IL-1 β , IL-10, IL-12 és a TNF- α esetében 10 pg/ml, az IL-6 és IL-8 esetében 5 pg/ml, az IL-18 esetében pedig 30 pg/ml.

3.13. Statisztikai analízis

A bemutatott adatokat a számtani közép (mean) standard deviáció \pm SD alapján prezentáltuk.

Az adatok statisztikai elemzése Student t-próbával történt.

4. Eredmények

4.1. A parlagfű pollen kivonat (RWE) erősíti az LPS által kiváltott NLRP3 inflmmoszóma aktivációt humán makrofág sejtekben

4.1.1. Az RWE növeli az LPS-indukálta IL-1 β szekréciót humán makrofágokban

Munkánk során elsőként a parlagfű pollen hatását vizsgáltuk a THP-1 sejtek IL-1 β termelésére. Annak érdekében, hogy elkerüljük a pollen szemek közvetlen kontaktusának aktiváló hatását, kísérleteinkben a parlagfű pollen szemekből nyert kivonatát használtuk (RWE). Mivel a kivonat nem tartalmazza a NADPH oxidáz szubsztrátját, a NADPH-t, ezért kísérleteinkben exogén módon adtuk azt a sejtekhez a kivonattal együtt. Munkánk során a PMA-val makrofágokká differenciáltatott THP-1 sejteket RWE-vel kezeltük NADPH jelenlétében és hiányában, illetve LPS-sel kombinálva és mértük a sejtek felülűszójában az IL-1 β mennyiségét. Azt az eredményt kaptuk, hogy bár az RWE a NADPH jelenlétében sem (NADPH önmagában sem) képes IL-1 β szekréciót kiváltani, mégis jelentősen fokozza az LPS által indukált IL-1 β termelést. A humán monocita eredetű makrofágok és dendritikus sejtek esetében is hasonló eredményeket kaptunk.

4.1.2. Az RWE ROS termelést vált ki, ROS inhibitorok pedig megszüntetik az LPS-indukálta, RWE által tovább fokozott IL-1 β termelést

Leírták, hogy a pollen NADPH oxidázok növeli a ROS mennyiségét a tüdő epitél sejtjeiben, az azonban eddig ismeretlen volt, hogy vajon az RWE képes-e ROS termelést kiváltani humán makrofágokban. Ezért munkánk során mértük a THP-1 sejtek intracelluláris ROS termelését a kezelések hatására. Azt az eredményt kaptuk, hogy míg az RWE önmagában is képes ROS termelést kiváltani (a NADPH önmagában nem képes), addig az RWE és a NADPH együttesen folyamatosan növekvő mennyiségű ROS-t generálnak. Korábbi irodalmi adatoknak megfelelően az LPS önmagában nem vált ki az általunk használt módszerrel detektálható mennyiségű ROS felszabadulást, továbbá nem fokozza az RWE által (NADPH jelenlétében) indukált ROS termelést sem. Annak kiderítésére, hogy vajon az RWE által tovább növelt IL-1 β szekréció ROS-mediált folyamat eredménye-e az LPS-aktivált sejtekben, ROS-scavenger NAC előkezelést végeztünk. Eredményeink azt mutatják, hogy a NAC teljesen megszüntette az IL-1 β szekréciót, ami arra utal, hogy a ROS-nak döntő szerepe van a folyamatban. Az IL-1 β szekréció hátterében álló ROS forrásának kiderítése érdekében a sejteket előkezeltük MitoTempoval (mitokondriális ROS inhibitor), valamint DPI-vel

(NADPH oxidáz és mitokondriális ROS inhibitor). Azt az eredményt kaptuk, hogy míg a MitoTEMPO csak kismértékben csökkentette az IL-1 β szekréciót, addig a DPI kezelés teljesen megszüntette azt. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az LPS-indukálta, RWE által tovább növelt IL-1 β termelés háttérben álló ROS döntően a pollen-eredetű NAPDH oxidázok következménye.

4.1.3. A kaszpáz-1 gátlása és az NLRP3 mRNS csendesítése megszünteti az LPS-indukált és RWE által tovább fokozott IL-1 β termelést

Annak igazolására, hogy az RWE által tovább növelt IL-1 β termelésben a kaszpáz-1 enzim működésének szerepe van, a THP-1 sejteket kaszpáz-1-specifikus Z-YVAD-FMK inhibitorral kezeltük elő az LPS és RWE kezelés előtt, majd mértük a sejtek IL-1 β szekrécióját ELISA módszerrel. Eredményeink szerint az inhibitor szignifikánsan csökkentette a kezelt sejtek IL-1 β termelését. Továbbá az NLRP3 expresszió csendesítésével (NLRP3-specifikus siRNS elektroporálásával) megállapítottuk, hogy az NLRP3-nak fontos szerepe van a fokozott IL-1 β termelésben, hiszen az siRNS alkalmazása teljesen megszüntette azt.

4.1.4. Az RWE fokozza az LPS-indukált „priming”-ot az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához

Az NLRP3 inflammoszóma aktivációjához és működéséhez a fehérje komplex tagjainak és a pro-IL-1 β -nak a fokozott expressziója szükséges. A THP-1 sejteket RWE és NADPH kezelésnek vetettük alá LPS jelenlétében és hiányában. Az LPS szignifikánsan indukálja az NLRP3, pro-kaspáz-1 és a kaszpáz-1 expresszióját. Azonban míg az RWE NADPH-val együttesen nem befolyásolta ezen fehérjék expresszióját, addig jelentősen tovább fokozta az LPS által indukált pro-kaspáz-1 és kaszpáz-1 kifejeződését. Bár az NLRP3 transzkripciója is nőtt, a növekedés mégsem volt szignifikáns a fehérje kifejeződésében. Ehhez hasonló eredményeket már leírtak korábban, melyekben az NLRP3 mRNS expressziója eltér a fehérje kifejeződésétől, azonban a pontos mechanizmus még nem ismert. Annak kiderítésére, hogy vajon a fokozott kaszpáz-1 expresszióval növekedett enzimaktivitás is együtt jár-e, vizsgáltuk a sejtek kaszpáz-1 enzim aktivitását. Azt találtuk, hogy míg az LPS szignifikáns kaszpáz-1 enzim aktivitást indít vált ki, az LPS-aktivált makrofágok RWE kezelése nem mutat nagyobb enzim aktivitást. Vizsgáltuk továbbá, hogyan hat az RWE magában és LPS-sel kombinálva a pro-IL-1 β és IL-1 β expressziójára. Azt kaptuk, hogy az RWE tovább fokozta mind az LPS-indukálta pro-IL-1 β expressziót, mind az érett IL-1 β szekréciót.

4.1.5. AZ RWE fokozza az inflammoszóma tagok és a pro-IL-1 β expresszióját, mely folyamat NADPH-dependens, és ROS inhibitor DPI-vel gátolható

Annak a kiderítésére, hogy a pro-IL-1 β és az inflammoszóma komponensek expressziójának RWE általi növekedése az RWE NADPH oxidázainak köszönhető-e, vizsgáltuk ezen fehérjék mRNS expresszióját NADPH jelenlétében és hiányában, és/vagy LPS-sel kombinálva. Eredményeink szerint az általunk vizsgált, fokozott mRNS expressziók NADPH-dependensek. Tovább vizsgálva a ROS szerepét ebben a folyamatban a DPI előkezelés hatását tanulmányoztuk az mRNS expressziókra. Azt találtuk, hogy a DPI jelentősen csökkentette a mRNS expressziókat az LPS- és/vagy RWE-kezelt sejtekben, tehát a ROS-nak jelentős szerepe van az általunk vizsgált folyamatokban.

4.1.6. Az RWE NADPH-függő módon aktiválja a p38 MAPK, JNK és AP-1 jelátviteli útvonalakat, mely p38 MAPK, JNK és AP-1 fokozott foszforilációjához vezet LPS-kezelt sejtekben

Annak kiderítésére, hogy milyen hatása van az RWE-nek azon jelátviteli útvonalakra, melyek részt vesznek az inflammoszóma tagok és az IL-1 β expressziójában, a p38 MAPK, JNK, és az I κ B foszforilációját vizsgáltuk a kezelések hatására Western blot technikával. Eredményeink azt mutatják, hogy az I κ B α kivételével a RWE NADPH-függő módon indukálja az általunk vizsgált fehérjék foszforilációját. Azt is kimutattuk, hogy az RWE NADPH jelenlétében tovább fokozza ezen fehérjék LPS által indukált foszforilációját. Vizsgáltuk továbbá az AP-1 komplex tagjainak (c-Jun, c-Fos) foszforilációját is, melyek szintén az IL-1 β termelésben fontos jelátviteli útvonalak fehérjéi. A kapott eredmények szerint az RWE NADPH-val együtt tovább emeli az AP-1 komplex tagjainak LPS-indukált foszforilációját.

4.2. A Nod-like receptorok és funkcionális partnereik konstitutív és UV-B modulált transzkripciója humán korneális epítél sejtekben

4.2.1. Az NLRP-k és inflammoszóma komponensek transzkripciója primer és immortalizált humán korneális epítél sejtekben

Vizsgálataink idején a TLR-ek korneális epítél sejtekben való expressziójáról állt rendelkezésre néhány irodalmi adat, azonban az NLR-ek és az inflammoszóma kifejeződése ekkor még ismeretlen volt ezekben a sejtekben. Ezért kísérleteinkben elsőként célul tűztük ki az NLRP-k (NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP4, NLRP6, NLRP7, NLRP10, NLRP12) és az inflammoszóma komponensek transzkripciójának vizsgálatát primer és immortalizált humán korneális epítél sejtekben. Azt találtuk, hogy az NLRP1 mRNS hasonlóan mennyiségben fejeződik ki mindkét sejttypusban. Az NLRP3 mRNS expressziója több, mint 20x nagyobb a sejtvonalba. Az NLRP7 mRNS csak nagyon alacsony mennyiségben volt detektálható és az is csak a sejtvonalba. Az NLRP10 expressziója nagyságrendekkel nagyobb a HCE-T sejtvonalba a primer sejtekben mérthez képest. Az NLRP4, NLRP6 és a NLRP12 nem volt detektálható egyik sejttypusban sem. Kimutattuk, hogy az NLRP1-nek egy rövidebb izoformáját fejezik ki a HCE-T sejtek, viszont az NLRP3 mRNS meglététől függetlenül a fehérje szintű kifejeződését már nem tudtuk detektálni.

Kimutattuk továbbá, hogy az ASC és a pro-kaspáz-1 mRNS kisebb mennyiségben expresszálódik a sejtvonalba. Míg a pro-kaspáz-1 fehérje jelenlétét kimutattuk a sejtvonalba, addig az aktivált formát nem tudtuk detektálni.

4.2.2. Az NLRC alcsalád expressziója primer és immortalizált humán korneális sejtekben

Az NLRP alcsalád tagjai mellett az NLRC alcsalád tagjainak (NOD1, NOD2, NLRX1 és NLRC5) expresszióját is vizsgáltuk humán korneális epítél sejtekben. A NOD1, NOD2 és NLRX1 mRNS hasonló mértékben expresszálódik a primer sejtekben, mint sejtvonalba. Az NLRC5 mRNS expressziója primer sejtek esetében a detektálhatósági szint alatt volt, de a sejtvonalba is csak alacsony szintű expressziót tudunk kimutatni.

Mivel a NOD1 és a NOD2 mRNS hasonló mértékben expresszálódik a primer sejtekben és a sejtvonalba, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy a HCE-T sejtvonala képes-e válaszreakciót mutatni a NOD1/NOD2-specifikus ligand kezelés hatására. Ennek kiderítésére a sejteket ultratiszta PGN-nel kezeltük, mely a NOD1 és a NOD2 specifikus ligandja. Ismert, hogy a NOD1 és a NOD2 aktiválása során az NF κ B út vonal is aktiválódik, melynek kimutatására jó

marker az I κ B foszforilációjának kimutatása. Kísérletünkben az I κ B foszforilációját vizsgáltuk időkinetikával a PGN kezelést követően. A foszforilációt ki tudtuk mutatni, mely a 4 órás kezelt mintában érte el a csúcsát. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a HCE-T sejtvonalon expresszálódó NOD1 és NOD2 funkcionálisan aktív. Ezért megállapítottuk, hogy a HCE-T sejtvonala jó modell rendszer lehet a NOD1 és a NOD2 tanulmányozására korneális epitél sejtekben.

4.2.3. Az UV-B sugárzás hatása az NLRP fehérjék transzkripciójára HCE-T sejtekben

Az egyik legfőbb környezeti stressz a kornea számára az UV-B sugárzás. Az UV-B sugárzásnak az NLRP-k expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálatához a HCE-T sejteket UV-B sugárzásnak tettük ki, majd 6 és 24 óra elteltével vizsgáltuk az expressziós szinteket a nem besugarazott mintákhoz képest. Eredményeink azt mutatják, hogy az NLRP2 és az NLRP7 kivételével az összes általunk vizsgált NLRP fehérje mRNS expressziója 6 órával a besugarazás után csökkent. Érdekes módon azonban 24 órával a besugarazás után az mRNS expressziók visszaálltak az eredeti szintjeikre. Sőt, az NLRP3 és az NLRP10 esetében szignifikáns expressziós növekedést is tapasztaltunk a nem-kezelt sejtekhez képest.

Vizsgáltuk továbbá az UV-B hatását az NLRP1 és NLRP3 fehérje kifejeződésére is. Eredményeink szerint az NLRP1 fehérje expressziója hasonlóan változott az mRNS-éhez: 6 órával a kezelést követően csökkent, majd 24 óra múlva visszaállt a kezdeti szintre. Bár az NLRP3 mRNS expressziója nőtt az UV-B kezelés hatására, a fehérje expressziója nem indukálódott az UV-B sugárzás hatására sem, így azt nem tudtuk detektálni.

4.2.4. Az UV-B sugárzás hatása az inflammoszóma adaptor és enzim transzkripciójára HCE-T sejtekben

Az UV-B sugárzás hatását az ASC és a kaspáz-1 expressziójára is vizsgáltuk. Azt az eredményt kaptuk, hogy mindkét fehérje mRNS expressziója csökkent 6 órával a kezelést követően, és ez a csökkent szint 24 óra múlva is megmaradt. A kaspáz-1 esetében ez a csökkenés a nem kezelt kontroll mintához képest szignifikánsnak bizonyult.

4.2.5. Az UV-B sugárzás hatása az NLRC fehérjék transzkripciójára HCE-T sejtekben

Az NLRC fehérjék mRNS expressziójának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az UV-B sugárzás után 6 órával az összes általunk vizsgált NLRC alcsalád tagjának (NOD1, NOD2, NLRC5 and NLRX1) csökkent az expressziója. Bár 24 órával a kezelés után a NOD1 és a NOD2 expressziója nőtt a 6 órás mintákban mértékhez képest, még így is az összes általunk

vizsgált NLRC kifejeződése alacsony szinten maradt a kontrollhoz viszonyítva. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy ellentétben az NLRP fehérjékkel, az NLRC-k UV-B hatására csökkent expressziós szintje hosszabb távon is fennmarad.

4.2.6. A HCE-T sejtek citokin szekréciója UV-B sugárzást követően

Mértük a nem kezelt és UV-B sugárzásnak kitett HCE-T sejtek felülúszójából az IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 és TNF α koncentrációját. Eredményeink szerint egyedül az IL-6 citokin szekréciója volt detektálható ELISA módszerrel. Az IL-6 termelés folyamatos, melyet az UV-B sugárzás 24 órával a kezelést követően kétszeresére növelt. Ezen eredmények azt mutatják, hogy az NLR-ek expressziójában bemutatott változások együtt járnak az IL-6 proinflammatorikus citokin növekedett szekréciójával UV-B sugárzás hatására.

5. Diszkusszió

1. rész

Az allergiás rhinitis legfőbb okozója a parlagfű pollen. Az IL-1 β az egyik legfontosabb proinflammatorikus citokin, mely allergiás rhinitisben szenvedő betegekben fokozott mértékben termelődik. Ennek a citokinnek a termelése az NLRP3 inflammoszóma aktivációjának következményeként a kaszpáz-1 enzim hasítása révén történik. Ismert, hogy az intracelluláris ROS termelés szerepet játszhat az NLRP3 inflammoszóma aktiválásában. Leírták, hogy a parlagfű pollen kivonat NADPH oxidáz aktivitással rendelkezik, mely ROS felszabadulást képes generálni. A legfőbb IL-1 β termelő sejtek a makrofágok. Allergiás asztmában szenvedő betegekből származó makrofágok több ROS-t termelnek az egészséges emberéhez képest. Ezen korábbi eredményekre alapozva célul tűztük ki a parlagfű pollen hatásának vizsgálatát az NLRP3 inflammoszóma működésére és az IL-1 β termelésre makrofágokká differenciáltatott THP-1 sejteken. Ismert, hogy az antigén prezentáló sejtek és a pollen szemek közti közvetlen kapcsolat az immun sejtek aktivációjához vezethet, mely felelős lehet a pollen szemek adjuváns hatásáért. Ezért ahhoz, hogy a parlagfű pollen komponensek közvetlen molekuláris hatásait tudjuk vizsgálni a makrofágokon, kísérleteinkben a parlagfű pollen kivonatát (RWE) használtuk, így elkerültük a pollen szemek direkt kontaktusából kialakításából származó sejtaktiváló hatását. A NADPH oxidáz természetes szubsztrátja a NADPH. Az RWE nem tartalmazza ezt a szubsztrátot, így a kísérleteink során exogén módon adtuk a sejtekhez azt az RWE-vel együtt. A természetben a pollen szemek általában „szennyezettek” bakteriális LPS-sel. Az LPS-ről ismert, hogy az egyik legfőbb aktivátora az NLRP3 inflammoszómának. Ezért kísérleteink során LPS kezelést is alkalmaztunk. Ismert, hogy az LPS önmagában nem képes IL-1 β termelést kiváltani THP-1 sejtekben. Azonban ha az LPS kezelés a sejtek PMA-val történő makrofággá differenciálása után történik, a THP-1 sejtek lépések lesznek az IL-1 β szekrécióra. Ezekkel az eredményekkel összhangban azt az eredményt kaptuk, hogy a differenciáltatott THP-1 sejtek IL-1 β -t szekretálnak LPS kezelés hatására, amely folyamatban a PMA kezelés indítja el a „priming” folyamatát. Azonban az RWE NADPH jelenlétében sem (illetve a NADPH önmagában sem) befolyásolta nem képes IL-1 β szekréciót indukálni. Ennek ellenére az RWE szignifikánsan tovább fokozta az LPS által indukált IL-1 β termelést. Ez az eredmény összhangban van azokkal az előzetes megfigyelésekkel, melyek szerint az endotoxin jelenléte fokozza a pollen szemek allergiás tüneteket kiváltó hatását.

Noha az IL-1 β termelésért az NLRP3 inflammoszómán kívül más inflammoszóma komplexek is (AIM2, NLRC4, NLRP1 inflammoszómák) felelősek lehetnek, előkísérleteink során kimutattuk, hogy az RWE NADPH és LPS jelenlétében sem befolyásolja ezeknek az inflammoszóma szenzoroknak az expresszióját.

Leírták, hogy a pollen ROS termelést generál légúti epitél sejtekben illetve dendritikus sejtekben. Azonban eddig nem állt rendelkezésre olyan irodalmi adat, melyben az RWE ROS-t indukáló hatását vizsgálták volna makrofág sejtekben. Kimutattuk, hogy az RWE önmagában is képes hosszantartó ROS termelést kiváltani a THP-1 makrofágokban. Ez összhangban áll azokkal az irodalmi adatokkal, melyek időben elnyúló ROS termelést mutatnak be pollen-kezelt alveoláris makrofágokban. Ezzel ellentétben - az irodalmi adatoknak megfelelően - az LPS kezelés során nem tudtunk kimutatni detektálható ROS termelést. Annak a kiderítésére, hogy az LPS-indukált és RWE által tovább fokozott IL-1 β termelésben a felszabadult ROS-nak szerepe van-e, a THP-1 sejteket ROS-scavengerrel (NAC), valamint ROS inhibitorokkal (MitoTempo, DPI) kezeltük elő. A MitoTEMPO a mitokondriális ROS termelés inhibitora, a DPI a NADPH oxidáz és ugyancsak a mitokondriális eredetű ROS termelés gátlószere. Kimutattuk, hogy a NAC megakadályozta az IL-1 β szekrécióját. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a ROS-nak döntő szerepe van az RWE által tovább fokozott IL-1 β termelésben. Míg a MitoTEMPO csak kismértékben csökkentette az IL-1 β termelést, addig a DPI képes volt teljesen gátolni azt. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az LPS-indukált, RWE által tovább növelt IL-1 β termelésben kulcsszerepet szerepet játszó ROS döntően pollen NADPH oxidáz eredetű.

Nemrégiben megjelent közlemények szerint a ROS nem közvetlenül aktiválja az NLRP3 inflammoszómát, de szerepe van az inflammoszóma aktiváláshoz vezető „priming” lépéshez. A mi kísérleti rendszerünkben, ahol a THP-1 sejteket makrofágokká differenciáltattuk PMA-kezeléssel, az RWE által indukált ROS a „priming”-hoz egy további aktivációs szignált biztosít az érett IL-1 β szekréciójához vezető úton. Ezt a hipotézist támasztja alá az az eredmény is, miszerint az RWE önmagában nincs hatással sem az inflammoszóma komponensek, sem az IL-1 β expressziójára, azonban jelentősen növeli az LPS-által kiváltott indukciókat.

A kaszpáz-1 szerepét is vizsgáltuk a kombinált kezelések által kiváltott IL-1 β termelésben. Ennek során kaszpáz-1-specifikus inhibitorral teljesen gátolni tudtuk az IL-1 β szekrécióját, tehát a kaszpáz-1-nek döntő szerepe van az kombinált kezelések hatására felszabaduló IL-1 β termelésben. Azt is kimutattuk, hogy az RWE fokozza az LPS által kiváltott pro- és hasított

kaspáz-1 fehérje kifejeződését, ennek ellenére nem befolyásolja az LPS-indukálta kaspáz-1 enzim aktivitását. Ez talán ellentmondásosnak tűnhet, de érdemes megjegyezni, hogy a Western blot technika csak a processzált formát mutatja ki, az enzim aktivitásától függetlenül. Azt is leírták, hogy a kaspáz-1 gyorsan inaktívvá válik THP-1 sejtekben, ami a processzált, de inaktív forma akkumulációjához vezet.

Az NLRP3 inflammoszóma tagok és az IL-1 β LPS-mediált expressziójában különböző jelátviteli útvonalak vesznek részt. Bár az RWE nem fokozta sem az IL-1 β , sem az NLRP3 és pro-kaspáz-1 expresszióját, kimutattuk, az RWE (NADPH jelenlétében) a p38 MAPK, JNK és az AP-1 komplex c-Fos és c-Jun tagjainak foszforilációját képes kiváltani. Ez a foszforiláció az RWE és az LPS együttes használatával jelentősen fokozódik. Ezek alapján arra következtetünk, hogy az LPS-indukálta és az RWE által generált ROS-függő módon tovább fokozott IL-1 β termelés összefüggésben áll a p38 MAPK, JNK és az AP-1 jelátviteli útvonalakkal.

Eredményeinket összefoglalva tehát elsőként publikáltuk, hogy az RWE NADPH jelenlétében szignifikánsan fokozza az LPS-indukálta IL-1 β szekréciót THP-1 sejtvonalon, illetve primer humán makrofágokban és dendritikus sejtekben. Kimutattuk, hogy a fokozott IL-1 β termelés az NLRP3 inflammoszóma által mediált folyamat következménye. Megállapítottuk, hogy az RWE citoszólikus ROS termelést vált ki, a ROS termelést gátló inhibitorok pedig megszüntetik az IL-1 β termelést. Azt is kimutattuk, hogy az RWE tovább fokozza az inflammoszóma tagok és a pro-IL-1 β LPS által indukált mRNS expresszióját a NADPH oxidázai révén termelt ROS-nak köszönhetően. Az RWE és az LPS kooperációja arra enged következtetni, hogy a bakteriális endotoxin szennyezettségnek fontos szerepe van a pollen által kiváltott allergiás reakciókban. Ez az ismeret jó alapja lehet az allergiás légúti betegségek kezelésére szolgáló terápia kifejlesztésének is.

2. rész

A makrofágok mellett az epitél sejtek is fontos szerepet töltenek be a különböző immunológiai folyamatokban. Az epitél sejtek a test felszíneit borítják, mint pl a bőr, a légutak, az emésztőrendszer vagy a szem, és fontos kapcsot jelentenek a külső környezet és a test belső részei között. Noha a szem immunológiailag privilégizált terület és immunrendszere eltér a más helyeken működő immunrendszertől, aktívan képes ellenállni a fertőző ágenseknek és a káros környezeti tényezőknek. A kornea immunrendszerének egyik legfontosabb sejtjei a korneális epitél sejtek, melyek nemcsak passzív fizikai barrierként védik a szemet, hanem aktív citokin, kemokin és antimikrobiális peptid termeléssel is. Vizsgálataink

idején a TLR-ek korneális epitel sejtekben való kifejeződéséről jelent meg néhány publikáció, azonban az NLR család tagjainak korneális epitel sejtekben való expressziójáról egyetlen publikáció sem állt rendelkezésre.

Ezért célul tűztük ki, hogy elsőként mutassuk be az NLR-ek és az inflammoszóma tagok expresszióját humán korneális epitel sejtekben. Munkánk során az is terveink között szerepelt, hogy találjunk egy olyan sejtvonalat, amely a primer sejtek analógjaként jó modellként szolgálhat az NLR-ek korneális epitel sejtekben való vizsgálatához, ezért összehasonlítottuk a primer sejtek és egy HCE-T nevű sejt vonal NLR-expressziós „mintázatát”.

Azt találtuk, hogy az NLRP1 kifejeződik és relatív expressziója hasonló mindkét sejt típusban. Egy másik munkacsoport később leírta, hogy az NLRP1 kifejeződik korneális epitel sejtekben, megerősítve ezzel a mi eredményünket. Az NLRP3 expressziója viszont kb. 20x nagyobb a sejt vonalban a primer sejtekhez képest. 2011-ben megjelent egy publikáció, melyben szintén leírják az NLRP3 kifejeződését a korneális epitel sejtekben, valamint azt, hogy bizonyos gombafajok képesek indukálni az NLRP3 mRNS expresszióját.

Az NLRP7 csak a sejt vonalban volt detektálható, alacsony relatív expresszióval. Az NLRP10 jelentősen magasabb expressziót mutatott a sejt vonalban. Az NLRP4, NLRP6 és az NLRP12 mRNS jelenléte nem volt detektálható egyik sejt típusban sem.

Az NLRP1 és az NLRP3 fehérje kifejeződésnek vizsgálatai során azt találtuk, hogy a sejt vonalban az NLRP1-nek egy kisebb izoformája expresszálódik, az NLRP3 fehérje jelenlétét pedig nem tudtuk detektálni. Ezek alapján a HCE-T sejt vonal nem lehet jó modell az NLRP1 és az NLRP3 inflammoszómák tanulmányozásához.

A korneális epitel sejtek fontos szerepet játszanak a cornea védelmében. Az egyik legfőbb környezeti stresszt a cornea számára az UV-B sugárzás jelenti. A szemet elérő UV-B sugárzás döntő részét a cornea nyeli el. Az UV-B sugárzás fotokeratitist idézhet elő, mely egy fájdalmas, cornea károsodással járó kórkép. A tünetek 6-12 órával az UV-B sugárzás után jelentkeznek és 48 órán belül rendszerint el is múlnak. Hosszútávon az UV-B sugárzás fokozhatja a patogének iránti fogékonyságot, mely felelőssé tehető a szemet érintő patológias folyamatok kialakulásáért. A bőr keratinocita sejtei is fontos elemei az immunrendszer első védelmi vonalának és ezek a sejtek szintén ki vannak téve az UV-B sugárzásnak. Korábban kimutatták, hogy a keratinocitákban expresszálódnak az inflammoszóma tagok és az UV-B hatásnak kitett sejtek képesek IL-1 β -t termelni kaspáz-1-dependens folyamat révén. Arról azonban nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok, hogy a korneális epitel sejtekben az UV-B sugárzás hatására hogyan változik az NLR-ek expressziója, ezért célul tűztük ki ennek vizsgálatát. Eredményeink szerint az UV-B sugárzás hatására az NLR-ek expressziója

csökken. Ez az eredmény összhangban áll az UV-B sugárzás immunosuppresszív hatásával. Azt is kimutattuk, hogy a korneális epitél sejtek – ellentétben a keratinocitákkal – nem termelnek IL-1 β -t, azonban UV-B sugárzás hatására egy másik proinflammatorikus citokinnek, az IL-6-nak a szekréciója mintegy kétszeresére nő a kontrollhoz képest. Előkísérleteink során megállapítottuk, hogy a HaCaT keratinocita sejtvonal sem képes IL-1 β -t szekretálni a primer sejtekkel ellentétben. Ezek a különbségek újabb példái annak a megfigyelésünknek, hogy primer korneális epitél sejtek nem azonos módon fejezik ki az NLR család egyes tagjait a sejtvonalhoz képest.

Egy másik kísérletünkben megállapítottuk, hogy a NOD1 és a NOD2 expressziója hasonló a két sejtípusban, ezért kíváncsiak voltunk arra, vajon a HCE-T sejtvonal jó modell lehet-e ezen fehérjék tanulmányozásaihoz a primer sejtek helyett. NOD1 és NOD2-specifikus ligand (PGN) használatával az I κ B foszforilációján keresztül vizsgáltuk a funkciójukat. Megállapítottuk, hogy a NOD1 és a NOD2 funkcionálisan aktív a HCE-T sejtvonalban, így jó modellként szolgálhat akár a szemet érintő bakteriális fertőzések esetén a NOD1/2 szerepének vizsgálataihoz. Nemrégiben megjelent néhány közlemény, melyekben szintén leírják a funkcionálisan aktív NOD1 és NOD2 jelenlétét korneális epitél sejtekben. Azt is kimutatták, hogy a NOD1 stimulációja fontos a neovaszkularizáció folyamatának elindításában, ami jó alap lehet a korneális neovaszkularizációt célzó terápiás lehetőségek kifejlesztésében. A korneális epitél sejtekben kifejeződő NOD1-nek és a NOD2-nek a szerepét leírták az antimikrobiális β -defensin 9 expressziójának szabályozása kapcsán is.

Az NLR család expressziója és funkciója korneális epitél sejtekben a mai napig kevésbé ismert, hiszen az említett néhány publikáció jelent meg ebben a témában a publikációnk megjelenése óta is. Elsőként mutatta ki munkacsoportunk az NLR-ek és az inflammoszóma tagok mRNS expresszióját primer humán epitél sejtekben és sejtvonalban.

6. Összefoglalás

Munkánk során kimutattuk a parlagfű pollen kivonat hatását az LPS-indukált makrofágok IL-1 β termelésére. Eredményeink szerint a parlagfű pollen kivonat (NADPH jelenlétében) nem befolyásolja szignifikánsan sem a primer humán makrofágok és dendritikus sejtek, sem a THP-1 makrofágok IL-1 β termelését, azonban jelentősen fokozza ezen sejtek LPS-indukált IL-1 β szekrécióját. Kimutattuk továbbá, hogy míg a parlagfű pollen kivonat – ellentétben a NADPH-val – önmagában is ROS termelést generál, együttesen fokozatosan növekvő mennyiségű ROS termelést váltanak ki a THP-1 sejtekben. Megállapítottuk, hogy a ROS, mely az LPS-indukált, pollen kivonat által tovább növelt IL-1 β termelés során keletkezik, nagymértékben a parlagfű pollen-eredetű NADPH oxidáz enzim működésének következménye. Azt is kimutattuk, hogy a növekedett IL-1 β szekréció NLRP3 és kaszpáz-1 enzim-dependens. A pollen kivonat tovább fokozza az LPS által indukált kaszpáz-1, valamint az IL-1 β protein expresszióját is. Az IL-1 β expressziójában fontos szereppel bíró jelátviteli útvonalak foszforilációs vizsgálatai során azt az eredményt kaptuk, hogy a parlagfű pollen kivonat NADPH-dependens módon indukálja a p38 MAPK és a JNK foszforilációját, valamint jelentősen növeli ezen fehérjék LPS által indukált foszforilációjának mértékét. A parlagfű pollen kivonat az AP-1 komplex c-Jun és c-Fos LPS-indukált foszforilációját is tovább növeli. A parlagfű pollen kivonat valamint az LPS kooperációja arra enged következtetni, hogy a pollen szemek bakteriális endotoxin „szennyezettsége” fontos szerepet játszhat a parlagfű pollen által kiváltott allergiás folyamatok kialakulásában.

A disszertáció alapjául szolgáló másik munkánk során a Nod-like receptorok és az inflammoszómatagok expresszióját vizsgáltuk primer humán korneális epitel sejtekben és a HCE-T humán korneális epitel sejtvonalban. Megállapítottuk, hogy a NOD1, NOD2, NLRX1 és az NLRP1 mRNS hasonló mértékben expresszálódik mind a primer sejtekben, mind a sejtvonalban, azonban míg az NLRP2 és az NLRP10 a sejtvonalban, az ASC és a kaszpáz-1 a primer sejtekben fejeződik ki nagyobb mértékben. Az NLRC5 és az NLRP7 mRNS a detektálhatósági szint közelében fejeződik ki. Munkánk során kimutattuk, hogy UV-B sugárzás hatására a kezelés után 6 órával az általunk vizsgált NLRP és NLRC proteinek, valamint az inflammoszómatagok mRNS expressziója csökkent, míg az NLRP fehérjék mRNS kifejeződése az UV-B sugárzás után 24 órával újra elérte a nem-kezelt sejtekben mért szintet. Az NLRP3 és az NLRP10 esetében pedig magasabb expressziót mutattunk ki a kontrollhoz képest. Az NLRP1 protein kisebb molekulásúlyú izoformáját mutattuk ki a HCE-T sejtekben, melynek expressziója UV-B hatására az mRNS-éhez hasonlóan változik. Az

NLRP3 fehérje jelenlétét nem tudtuk detektálni a HCE-T sejtvonalban. Az általunk vizsgált proinflammatorikus citokinek közül az IL-6 szekréciója mutatható ki a sejtek felülűszójából, melynek mennyisége az UV-B sugárzás hatására a kezelést követő 24 óra múlva nőtt. Megállapítottuk, hogy a korneális epitél sejtvonalban expresszálódó NOD1 és NOD2 funkcionálisan is aktív, így jó modell rendszert nyújthat a korneában található NOD proteinek vizsgálataihoz, melyek új teret nyithatnak a szemet érintő „danger szignál”-eredetű betegségek elleni új terápiás lehetőségek kidolgozásához.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
PUBLIKÁCIÓK



Iktatószám: DEENKÉTK/111/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. Publikációs Lista

Jelölt: Varga Alíz

Neptun kód: LKUMIN

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Varga, A.**, Budai, M., Milesz, S., Bácsi, A., Tőzsér, J., Benkő, S.: Ragweed pollen extract intensifies LPS-induced priming of NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Immunology*. 138 (4), 392-401, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12052>
IF:3.705 (2012)
2. Benkő, S., Tőzsér, J., Miklóssy, G., **Varga, A.**, Kádas, J., Csutak, A., Berta, A., Rajnavölgyi, É.: Constitutive and UV-B modulated transcription of Nod-like receptors and their functional partners in human corneal epithelial cells. *Mol. Vis.* 14 (187-188), 1575-1583, 2008.
IF:2.464





További Közlemények

3. Budai, M.M., Varga, A., Milesz, S., Tózsér, J., Benkő, S.: Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages.
Mol. Immunol. 56 (4), 471-479, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.005>
IF:2.645 (2012)

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 8.814

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6.169

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudánymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.05.16



Szöbeli prezentációk:

Aliz Varga: Nod-like receptors (NLRs) in epithelial cells. 4th Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2011. január

Aliz Varga, Marietta Margit Budai, Réka Albert, Éva Rajnavölgyi, Goran Petrovski, József Tózsér, Szilvia Benkő: Comparison of Nod-like receptors in limbal stem cell derived corneal epithelial cells and in immortalized corneal epithelial cell. „Fókuszban az őssejt-kutatás” - Az őssejt kutatás kardiovaszkuláris vonatkozásai, Debrecen, 2011. március

Aliz Varga: Ragweed pollen extract generated ROS enhances LPS-induced IL-1 β secretion via NLRP3 inflammasome in human macrophages. 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2012. January

Poszter prezentációk:

Aliz Varga, Marietta Margit Budai, Attila Bácsi, József Tózsér, Szilvia Benkő: Ragweed pollen extract generated ROS enhances LPS-induced IL-1 β secretion via NLRP3 inflammasome in human macrophages. 16th International Summer School on Immunology, Hvar, Croatia September 3-11, 2011

Varga Aliz, Budai Marietta Margit, Bácsi Attila, Tózsér József, Benkő Szilvia: A parlagnő pollen kivonat által termelt ROS az NLRP3-inflammoszómán keresztül fokozza az LPS-indukálta IL-1 β szekréciót humán makrofág sejtekben. A Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október

Varga Diána, **Varga Aliz, Budai Marietta Margit, Bácsi Attila, Tózsér József, Benkő Szilvia:** A parlagnő pollen kivonat IL-1 β expresszióra kifejtett hatása humán THP-1 makrofág sejtekben. A Magyar Élettani Társaság, a Magyar Anatómusok Társasága, a Magyar Biofizikai Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság Kongresszusa, Debrecen, 2012. június

Aliz Varga, Marietta Margit Budai, Attila Bácsi, József Tózsér, Szilvia Benkő: Ragweed pollen extract enhances LPS-induced IL-1 β secretion via NLRP3 inflammasome in human macrophages. European Macrophage and Dendritic Cell Society 2012 Meeting, Debrecen, September 1-3, 2012

Aliz Varga, Marietta Margit Budai, László Csernoch, József Tózsér, Szilvia Benkő: Effect of ragweed pollen extract on the IL-1 β expression of macrophages and dendritic cells. A Magyar Immunológiai Társaság 42. Vándorgyűlése, Pécs, 2013. október

8. Tárgyszavak

Nod-like receptorok, NLRP3 inflammoszóma, IL-1 β termelés, reaktív oxigén gyökök, parlagnyű pollen, NADPH oxidáz, makrofágok, korneális epitél sejtek, UV-B

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném hálámat kifejezni témavezetőnek, Dr. Benkő Szilviának, aki bevezetett a kutatómunka rejtelmeibe, aki önzetlen, kitartó munkájával megtanított elsajátítani a molekuláris biológiai módszerek széles tárházát, aki nem csak a kutatómunka, de az élet más területein is a kitartás és precizitás példáját mutatta nekem.

Hálás vagyok Tőzsér József professzor úrnak a sok év alatt nyújtott rengeteg szakmai segítségért. Köszönettel tartozom Csernoch László professzor úrnak, hogy az Élettani Intézetben lehetővé tette számomra szakmai álmaim megvalósítását. Hálámat szeretném kifejezni Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának, hogy az Immunológiai Intézetben lehetővé tette számomra a szakmai céljaim felé vezető út kitaposását.

Köszönet illeti kolléganőmet és barátnőmet, Budai Mariettát azért az önzetlen segítségért, amit a laborban eltöltött munkám során kaptam tőle.

Hálás vagyok az Immunológiai Intézet és az Élettani Intézet összes munkatársának, akik mindig támogató és barátságos környezetet jelentettek számomra. Köszönet a kollaborációs partnereknek a kitűnő munkájukért és szakmai segítségeikért.

És végül, de nem utolsósorban, hálás vagyok a Családomnak és a Barátaimnak, akik folyamatosan mellettem álltak és mindvégig bátorítottak a nehéz időkben is.