

# EGYETEMI DOKTOR (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

---

## A MAKROFÁGOK ÁLTAL TERMELT EFFERO-CITÓZIS- FÜGGŐEN FELSZABADULÓ MOLEKULÁK SZEREPE AZ APOPTO-FAGOCITÓZIS PROGRAM SZABÁLYOZÁSÁBAN

**KISS BEÁTA**

*TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA*



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

**A MAKROFÁGOK ÁLTAL TERMELT EFFEROCITÓZIS-FÜGGŐEN  
FELSZABADULÓ MOLEKULÁK SZEREPE AZ APOPTO-FAGOCITÓZIS PROGRAM  
SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a klinikai orvostudományok tudományágban

**ÍRTA: KISS BEÁTA**

OKLEVELES MOLEKULÁRIS BIOLÓGUS/BIOKÉMIKUS

Készült a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Doktori Iskolája keretében

**TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA, AZ MTA DOKTORA**

A Doktori Szigorlati Bizottság Elnöke: PROF. DR. MATESZ KLÁRA, AZ MTA DOKTORA

A Doktori Szigorlati Bizottság Tagjai: PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA  
PROF. DR. GALLYAS FERENC, AZ MTA DOKTORA

A Doktori Szigorlat Időpontja, Helye: 2015. December 4. 10:00  
Debreceni Egyetem, FOK  
Konzerváló Fogászati Tanszék, Dékáni Tárgyaló

Az Értekezés Bírálói: PROF. DR. SÁRMAY GABRIELLA, AZ MTA DOKTORA  
DR. KONCZ GÁBOR, PHD

A Bírálóbizottság Elnöke: PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, AZ MTA DOKTORA

A Bírálóbizottság Tagjai: PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA  
PROF. DR. GALLYAS FERENC, AZ MTA DOKTORA  
PROF. DR. SÁRMAY GABRIELLA, AZ MTA DOKTORA  
DR. KONCZ GÁBOR, PHD

Az Értekezés Védésének Időpontja, Helye: 2017. Március 29. 13:00  
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet  
Reumatológiai Tanszék tanterme

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. APOPTÓZIS

A soksejtű szervezeteknek szükségük van az életműködésük szempontjában feleslegessé váló, illetve az életfolyamatokat akadályozó vagy arra veszélyes sejtektől való megszabadulásra. Ez a folyamat általában programozott sejthalál vagy apoptózis révén valósul meg. Az apoptózis meghatározó szerepet tölt be a megfelelően működő immunrendszer kialakításában, mind a sejtek számának, mind azok működésének szabályozása révén.

### **Az apoptózis mechanizmusa**

Az immunrendszerben naponta  $10^9$  nagyságrendű sejt pusztul el programozott módon apoptózissal a nyiroksejtek érése, válogatása és életciklusa során. Az apoptózis szabályozásában központi szerepet töltenek be az aktiválódó végrehajtó, ún. effektor kaspázok (-3, -6 és -7), melyek egy proteolitikus kaskád részeként több száz fehérjét hasítanak, kialakítva ezzel az apoptózisra jellemző morfológiai változásokat (sejt membránváltozások, sejt zsugorodás, sejtmagi DNS kondenzációja, fragmentációja stb). Az effektor kaspázok aktivációja 2 fő úton érhető el. Egyrészt a kaspáz-8 iniciátor kaspáz aktiválásával, mely a sejtfelszínen található sejthalál receptorok, pl Fas, TRAIL ligandkötése és konformációváltozása révén proteolitikus hasítással történik nagy multidomén-komplexekbe rendeződve. Másrészt pedig a kaspáz-9 aktiválása révén, ami a Bcl-2 fehérjecsalád szabályozása alatt álló mitokondriális útvonal iniciátor kaspáza. Aktiválása a mitokondrium membránjában megjelenő Bax-Bak csatornákon keresztül felszabaduló citokróm-c és a citoplazmában jelenlévő Apaf-1 alkotta apoptoszóma révén zajlik. Egyes sejtekben az aktiválódó kaspáz-8 mennyisége nem éri el a kaspáz kaskád beindításához szükséges küszöbértéket, a két útvonal összekapcsolására van szükség. A kapcsolómolekula a csak BH3 fehérje Bid, ami inaktív formában a citoplazmában található. Kaspáz-8 hasítást követően a mitokondriumba jutva az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjéket gátolva, illetve a pro-apoptotikus Bax és Bak molekulák homodimerizációját ösztönözve, serkenti a citokróm c molekulák mitokondriumból citoplazmába irányuló kiáramlását.

### **Az apoptózis szerepe a T-limfociták fejlődésében**

A T-sejtek érésében a tímusz kitüntetett szerepet játszik, ahol az epitheliális sejtek, dendritikus sejtek, makrofágok által szekretált molekulák biztosítják a T-limfociták differenciálódásához szükséges mikrokörnyeztetet. A T-limfociták progenitor sejtei a csontvelőből a tímuszba vándorolnak, ahol a kéregállományban a T-sejt receptor (TCR)  $\alpha\beta$ -láncot, CD4-et és CD8-at nem

expresszálo előalakok egy többlépcsős folyamat során funkcionális TCR-t hordozó dupla pozitív (DP) timocitákká válnak, azaz megjelenik rajtuk mindhárom struktúra. Ezután a DP sejtek egy szigorú szelekciós folyamattal néznek szembe, kölcsönhatásba lépnek a kéri hámsejtek fő hisztokompatibilitási komplex I (MHCI) és II (MHCII) molekuláival. Azok a timociták, amelyek nem reagálnak az egyedre jellemző MHC molekulákkal, aktiváció hiányában neglekciónal elpusztulnak, míg a túl nagy affinitású kötődés apoptózishoz vezet (negatív szelekció). A viszonylag kis affinitású kötődés a CD8+ vagy CD4+ irányú differenciálódást indít el (pozitív szelekció).

### **A negatív szelekcióban szerepet játszó pro-apoptotikus faktorok**

A negatív szelekció folyamatában kritikus szerepet tölt be a Nur77, a szteroid/tiroid magreceptor családba tartozó transzkripciós faktor. A Nur77 génexpresszióra gyakorolt hatását monomerként, homodimerként, valamint más magreceptorokkal, pl. a retinoid X receptorral heterodimert alkotva fejt ki. A Nur77 a T-sejt receptor kiváltotta sejthalál során gyorsan indukálódik. A domináns negatív Nur77 fehérjét expresszálo transzgen egérben a negatív szelekcióval párosuló apoptózis nem megy végbe, ugyanakkor a Nur77 konstitutív expressziója masszív timocita sejtelhalást eredményez. Winoto és munkatársai a Nur77 célgének között azonosítottak néhány pro-apoptotikus funkciójú gént (FasL, TRAIL és NDG1), melyek a kaspáz-8 aktiválásán keresztül váltanak ki apoptózist. A Nur77 transzkripciós aktivitásától függetlenül is hozzájárul a sejthalál elindításához, a mitokondriumba jutva az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérje pro-apoptotikus molekulává történő konverziója révén. A negatív szelekció apoptotikus folyamatát szabályozó másik kulcs fehérje a pro-apoptotikus Bim, ami fokozott mértékben fejeződik ki TCR ligálást követően. Bim hiánya a timocita sejtelhalás zavarát és az autoreaktív T-sejtek megjelenését eredményezi a periférián. Kimutatták, hogy a TCR stimulus hatására Bim szekvesztrálja a Bcl-XL fehérjét, megakadályozva annak anti-apoptotikus működését.

## **1.2. AZ APOPTOTIKUS SEJTEK FAGOCITÓZISA ÉS A GYULLADÁSI FOLYAMATOK KAPCSOLATA**

### **Az apoptotikus sejtek eltakarítása**

Naponta kb. egy billió sejt hal el test szerre apoptózissal. A keletkező apoptotikus maradványok gyors felismerését és eltávolítását a szomszédos sejtek vagy specializált fagociták (makrofágok, dendritikus sejtek) végzik gyulladási immunválasz kiváltása nélkül. Ezt a folyamatot efferocitózissal nevezzük. Az elhaló sejtekből felszabaduló kemotaktikus szignálok odavonzzák a makrofágokat. Az apoptotikus sejtek felszínükön „egyél meg” szignálokat (pl. foszfatidil-szerin (PtdSer) jelenítenek meg, amiket a megjelenő fagocita sejtek specifikus receptorai és hídképző molekulái ismernek fel. Az elinduló intracelluláris jelátviteli út citoskeleton átrendeződéshez és az

apoptotikus testek bekebelezéséhez, valamint azt ezt követő processzáshoz vezet. Az elhaló sejtek eltakarítása során a makrofágok szolubilis gyulladáscsökkentő szignálokat bocsátanak ki, pl interleukin (IL)-10, transzformáló növekedési faktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), a prosztaglandin E2 (PGE2). Laborunkban folyó korábbi kutatások két ilyen efferocitózis-függően felszabaduló mediátort azonosítottak: a retinsavakat és az adenoizint.

### 1.3. RETINOIDOK ÉS HATÁSUK

A retinoidok az A-vitamin természetes és mesterséges származékai. Az A-vitamin biológiai hatásának jelentős részét aktív metabolitjai – a transz-retinsav (ATRA) és a 9-cisz-retinsav (9cRA) közvetítik. A retinol transz-retinsavvá történő oxidatív átalakítása során a retinolból először retinaldehid keletkezik, ezt követi a retinaldehid irreverzibilis átalakítása retinsavvá. A 9-cisz retinsav izomerizációs reakció után keletkezik transz-retinsavból. Génexpressziót reguláló hatásukat specifikus magreceptorokon – a retinsav receptorokon (RAR) és retinoid x receptorokon (RXR) – keresztül fejtik ki, melyek ligand-függő transzkripció faktoroként szabályozzák gének átírását. Az RAR receptorok ligálásában az ATRA és a 9cRA egyaránt nagy affinitással vesz részt, míg az RXR csak a 9cRA-t köti nagy affinitással, az ATRA iránti affinitása 50-szer kisebb. Az RAR receptorok az RXR-ral heterodimert alkotva funkcionálnak. Az RXR képes homodimer kialakítására is, ugyanakkor általános heterodimerizációs partnerként az RAR-en kívül más magreceptorral is kölcsönhatásba léphet, például a Nur77-tel.

### 1.4. ADENOZIN

#### Adenozin metabolizmus és adenozin receptor jelátvitel

Az adenozin, az adenin nukleotidok defoszforilációjával keletkező purin nukleozid, a központi idegrendszer valamint az immunrendszer egyik fontos regulátora. Fertőzés, gyulladás, metabolikus és hipoxiás stressz során a sérült sejtek közelében hatalmas mennyiségű adenozin szabadul fel. Az intracelluláris adenozin 5'-adenozin-monofoszfát prekurból keletkezik. Megfelelően magas koncentrációt elérve kijut az extracelluláris térbe. Az extracelluláris adenozin a sejtekből felszabaduló nucleotidok (ATP, ADP, AMP) metabolizmusa során képződik a CD39 és a CD73 (ekto-5'-nucleotidáz) enzim közvetítésével. Az adenozin jelátvitel befejezését az adenozin deamináz biztosítja adenozin inozinná történő deaminációját katalizálva.

Az adenozin biológiai hatását négy G-fehérjéhez kapcsolt receptorán keresztül fejt ki. Ezek mindegyike kifejeződik a makrofágok által: A<sub>1</sub> (A<sub>1</sub>R), A<sub>2A</sub> (A<sub>2A</sub>R), A<sub>2B</sub> (A<sub>2B</sub>R) és A<sub>3</sub> (A<sub>3</sub>R). Az A<sub>1</sub>R és A<sub>3</sub>R Gi-kapcsolt receptorok, melyek az adenilát-cikláz gátlásán keresztül csökkentik az intracelluláris ciklikus AMP (cAMP) szintet. A A<sub>2A</sub> és A<sub>2B</sub> receptorok Gs-kapcsolt adenozin receptorok, melyek az adenilát-cikláz aktiválva kiváltják a cAMP szint növekedését és a protein

kináz A aktiválását. Az A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> és A<sub>3</sub> receptor altípusokat alacsonyabb adenozin koncentráció stimulálja, míg az A<sub>2B</sub> receptor aktiválása magasabb koncentrációt igényel.

### **Az adenozin immunmoduláló hatásai**

Az immunrendszer számos sejtípusa (makrofágok, dendritikus sejtek, neutrofilek) kifejezi az adenozin receptorokat. Az aktivált receptortól függően az adenozin különböző akut (szepszis) és krónikus (asztma) gyulladásai folyamatokra adott immunválasz modulátora. Neutrofilekben A<sub>1</sub>R aktivációja elősegíti a migrációt és fokozza az endotéliumhoz történő tapadásukat. Ugyanakkor az adenozin az A<sub>2A</sub> receptoron keresztül csökkenti a neutrofil-endotélsejt adherenciát, gátolja a migrációt és a szabad gyökök szintézisét, valamint csökkenti számos gyulladásai citokin termelődését. Makrofágokban szintén az A<sub>2A</sub>R játszik legnagyobb szerepet a gyulladásai folyamatok gátlásában. Gátolja a baktériális lipopoliszacharid (LPS) által aktivált makrofágok gyulladásai citokin termelődését (Tumor-nekrózis faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-6, IL-12), továbbá csökkenti a makrofág gyulladásai protein (MIP)-1 $\alpha$  és a nitrogén-monoxid szintjét. Amellett, hogy az adenozin/A<sub>2A</sub>R jeávtitel gátolja a gyulladásai mediátorok képződését, fokozza a gyulladásicsökkentő és immunszuppresszááló hatású IL-10 termelődését.

## **1.5. A PATOGÉNEK FELISMERÉSE ÉS A TOLL-LIKE RECEPTOR JELÁTVITEL**

A veleszületett immunitás elemei a szervezet integritását hivatottak biztosítani külső betolakodók és kóros belső elváltozások ellen, melynek alapja a patogének molekuláris mintázatának gyors felismerése mintázatfelismerő receptorok (pattern recognition receptors, PRR) segítségével. A PRR-családba tartoznak a szöveti makrofágok és dendritikus sejtek Toll-like receptorai (TLR). A TLR-ok több altípusa ismert, munkám során a TLR4 közvetítte jelátviteli útra fókuszáltam, melynek fő aktivátorai a Gram- baktériumok sejtfalában jelenlévő lipopoliszacharidok (LPS)

### **LPS-indukálta TLR4 jelátvitel**

A hatékony TLR4-mediált sejtaktivációhoz a specifikus felismerésen túl a receptor komplex különböző tagjai (LPS kötőfehérje (LBP), CD14, MD-2 és a TLR4) közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás is elengedhetetlen. Az LBP és CD14 közvetlenül kötődik az LPS-hez. Az LBP egy szolubilis fehérje, ami a LPS és CD14 közötti asszociációt segíti elő. CD14-nek az LPS TLR4/MD-2 receptor komplexre történő transzferében van szerepe. TLR4 ligand kötésre oligomerizálódik és a sejten belül a Toll-interleukin-1 receptor (TIR) doméneken keresztül adapter molekulák kapcsolódnak hozzá. Ilyen adaptor fehérje a MyD88 és a TRIF, melyek egymástól eltérő jelátviteli utat indítanak el. A TRIF által indított jelátvitel az interferon szabályozó transzkripció faktorokon

(IRF3, IRF7) keresztül szabályozza az I. típusú interferon géneket, valamint egy lassú nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) aktivációt indít el.

A MyD88-függő jelátvitel felelős az NF- $\kappa$ B korai aktivációjáért, valamint a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) kaszkád elindításáért, melyek a gyulladásos citokinek termelődését szabályozzák. Nyugvó sejtekben az NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B gátlása alatt áll. TLR4 aktivációt követően az inhibitor fehérjét foszforiláló I $\kappa$ B kináz komplex aktiválódik. A foszforiláció következményeként az inhibitorikus fehérje lebomlik, az NF- $\kappa$ B felszabadul a gátlás alól, a sejtmagba transzlokálódik, amit pro-inflammatorikus gének pl. IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  expressziója követ.

A MAPK családba három, funkcionálisan különböző kináz tartozik. A mitogén- és differenciálódási jelek közvetítéséért extracelluláris jel által szabályozott kináz (ERK) fehérjék felelősek, míg a p38 és JNK (c-Jun N-terminális kináz) csoportba tartozó kinázok a stressz és a gyulladásos citokinek által kiváltott válaszban vesznek részt, de az egyes utak között együttműködés figyelhető meg. A MAPK jelátviteli modulok egy-egy háromszintű kináz kaszkádba rendeződnek és egymást követő foszforiláció révén aktiválják a MAP kinázokat. Az Erk, a JNK és a p38 útvonalra más-más „upstream” kináz jellemző, és más transzkripció faktorokat aktivál. Az aktív MAPK-ok a sejtmagba jutva korai aktivációs géneket szabályoznak, mint a c-fos, c-jun és c-myc. A MAPK-útvonal kikapcsolását a kettős specifitású foszfatázok végzik.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A posztnatális tímuszban az apoptózis és az apoptotikus sejtek eltávolítása állandóan végbemenő folyamat. Az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok szolubilis mediátorokat bocsátanak ki, melyek hozzájárulnak egy olyan tímikus környezet kialakításához, ami szabályozza az éretlen timociták apoptózisát és differenciálódását. Munkacsoportunk és más laborok előzetes kutatásai kimutatták, hogy a retinoidok *in vivo* keletkeznek a tímuszban, melyek képesek kiváltani az éretlen tímuszsejtek elhalását. Továbbá azt is leírtuk, hogy a retinoidok transzkripció-függő apoptózist váltanak ki ezekben a sejtekben az RAR $\gamma$  receptor aktiválásán keresztül.

- Mivel ezidáig nem vizsgálták a retinoidok sejthalált kiváltó hatását tímuszsejtekben, disszertációm első részében azt kívántam tanulmányozni, hogy a retinoidok milyen mechanizmus révén indítják el az apoptózis programot az éretlen timocitákban.

Korábbi tanulmányok bemutatták, hogy LPS kezelés hatására a makrofágok ATP-t bocsátanak ki, ami CD39-függő ATP degradációhoz és extracelluláris adenzin termeléshez vezet, valamint az NF- $\kappa$ B útvonalon keresztül fokozódik az A<sub>2A</sub> receptorok kifejeződése is. Mivel az adenzinről ismert, hogy az A<sub>2A</sub> receptoron keresztül hatva gátolja a LPS stimulált makrofágok gyulladási citokin termelését, az A<sub>2A</sub> receptorok LPS által indukált megjelenése negatív feedback szerepet tölthet be az LPS válasz regulációjában.

- Ezen adatok alapján A<sub>2A</sub> receptor hiányos makrofágok vizsgálatával karakterizálni kívántuk azt a részletes jelátviteli útvonalat, mellyel adenzin az A<sub>2A</sub> receptor aktiválásán keresztül csökkenti az LPS stimulált makrofágok gyulladási citokin termelését.



### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### Kísérleti állatok

A sejtihalál kísérletek többségét 4 hetes C57BL/6 vad típusú és Nur77 hiányos egerekből izolált tímuszsejtekkel végeztük, néhány kísérlet esetében pedig STAT1 hiányos timocitákkal dolgoztunk. A csontvelői makrofág prekursorokat 3-6 hónapos vad típusú és and  $A_{2A}$  receptor hiányos (FVB alapon) egerekből izoláltuk. Minden kísérlet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével történt.

#### Sejttenyésztés

A timocita sejt kultúrákat 4 hetes egerekből nyertük ki a tímusz eltávolítása, majd steril szűrőn keresztül történő átnyomása révén. A sejteket PBS-sel történő mosás és a végleges sejtszám ( $5 \times 10^6$  cells/ml) beállítása után RPMI 1640 tápfolyadékban (10% FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM Napirovát, 50  $\mu$ M 2-merkaptotanol, 100 U/ml penicillin/100  $\mu$ g/ml streptomycin) tenyésztettük. Csontvelői sejtekből differenciáltott makrofágok (BMDM) esetében, a progenitor sejteket egerek combcsontjából izolált csontvelőből nyertük ki steril fiziológiás sóoldattal, majd DMEM tápfolyadékban (10% hővel inaktivált FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin/100  $\mu$ g/ml streptomycin) GM-CSF jelenlétében (10% L929 fibroblaszt sejt felülszó) termosztátban (37°C, 5%  $CO_2$ ) 7 napon keresztül tenyésztettük.

#### Az apoptotikus timociták számának meghatározása

A degradált DNS mennyiségének meghatározásához mintánként  $10^6$  timocitát használtunk fel. A timocitákat különböző koncentrációjú retinsavakkal, dexametazon-acetáttal (0.1  $\mu$ M) vagy Jo2 antitesttel (1  $\mu$ g/ml) kezeltük 6 órán keresztül. A kaszpázok szerepének vizsgálatára bizonyos esetekben a sejteket 40  $\mu$ M z-IETD-fmk, kaszpáz-8 inhibitorral (BD Pharmingen) vagy 75  $\mu$ M z-LEHD-fmk, kaszpáz-9 specifikus inhibitorral (Calbiochem) kezeltük elő 1 órán át. Az inkubálást követően a sejteket lecentrifugáltuk, PBS-sel mostuk, majd 400  $\mu$ l jég hideg, 70%-os etanolban 5 percig fixáltuk. Ismételt centrifugálás és mosás után a tímuszsejteket 50  $\mu$ g/ml végkoncentrációjú propidium-jodidot (5 mg/ml) és 100  $\mu$ g/ml végkoncentrációjú RNáz-oldatot (10 mg/ml) tartalmazó eleggyel festettük. Az apoptózis során a DNS degradálódik a sejtmagban, kialakul egy csökkent DNS tartalmú populáció, mely a szub- $G_0/G_1$  fázisban detektálható az áramlási citometriával készített hisztogrammon. Az apoptotikus sejtek százalékos arányát a teljes populációra vonatkoztatva adtuk meg.

## **Áramlási citometria**

$5 \times 10^5$  csontvelőből differenciáltot makrofágot 200 ng/ml LPS-sel kezeltük a jelölt ideig. A kezelések után a makrofágokat lemostuk (1xPBS), összegyűjtöttük és blokkoltuk 50% FBS-sel 30 percig majd anti-egér A<sub>2</sub>R antitesttel vagy kecske IgG izotípus kontrollal jelöltük. A sejtek detektálására FITC-konjugált anti-kecske IgG-t alkalmaztunk. A megfestett sejteket FACSCalibur segítségével analizáltuk. Az eredményeket WinMDI 2.9 szoftverrel értékeltük ki.

## **Western blot analízis**

Kísérleteink során tímuszsejtekből és csontvelői makrofágokból kinyert teljes sejtlizátummal dolgoztunk. A fehérje mennyiségét 1 mg/ml-re állítottuk be Laemmli denaturáló oldat segítségével. A fehérjék szétválasztását 12 %-os poliakrilamid gélen Bio-Rad elektroforetikus rendszerrel végeztük. A blotolást követően a membránok szabad kötőhelyeit 5%-os száraz tejporral (20 mM Tris, 0.1 M NaCl pufferben, 0.1%-os Tween-nel) blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A membránokat ezután 4°C éjszakán át inkubáltuk anti-Nur77, anti-Bid, anti-Bim, anti-STAT1, anti-MKK3/4, anti-foszfo-MKK3/4/6 (Cell Signaling), anti-IκB (Santa Cruz Biotechnology), anti-foszfo-(Thr183/Tyr185)-SAPK/JNK (Cell Signaling) antitestekkel. A másodlagos antitestként peroxidáz-konjugált egér IgG (1:1000), patkány IgG (1:10000) vagy nyúl IgG (1:10000) ellenes antitesteket használtunk (Sigma-Aldrich, USA). Az antigén-antitest komplexeket kemiluminescens Immobilon Western Chemiluminescent HRP (ECL )(Merck Millipore) szubsztráttal tettük láthatóvá.

## **Teljes RNS izolálása és kvantitatív RT-QPCR**

Totál RNS-t a kontroll és különbözőképp kezelt BMDM makrofágokból ( $3 \times 10^6$  sejt/minta) vagy tímocitákból ( $5 \times 10^6$  sejt/minta) izoláltuk TRI-reagens felhasználásával, a gyártó által megadott instrukciók alapján. A különböző kezelések után, a makrofágokat lemostuk jéghideg PBS-sel. A minták koncentrációját és tisztaságát Nanodrop Spektrofotométer segítségével mértük. A totál RNS (1µg/minta) cDNS-sé történő átirásához High Capacity cDNA RT Kitet használtunk. A különböző gének génexpressziós változásainak detektálása valós idejű kvantitatív PCR technikával történt, melyhez génspecifikus FAM-MGB-jelölt, primereket és próbákat tartalmazó oligo mixeket (TaqMan Gene Expression Assay) használtunk. A mintákat Roche LightCycler LC480 készülék segítségével triplikátumokban futtattuk. Az adatok kiértékelése SDS 2.1 programmal történt. A génexpressziós szinteket komparatív CT (ddCT) módszerrel határoztuk meg, melyhez normalizáló génként ciklofillint (tímociták esetében) vagy hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferázt (HPGRT) (makrofágok esetében) használtunk.

### **Mitokondrium frakció izolálása**

Mintánként  $10^7$  timocitát használtunk a különböző kezelésekhöz. A mitokondrium izolálást a ProteoExtract Cytosol/Mitochondria Fractionation Kit (Calbiochem) segítségével végeztük el a gyártó utasításainak megfelelően. A kit használatával kinyert mitokondriális frakció fehérjetartalmát 5x Laemmli denaturáló oldat segítségével állítottuk be, majd a továbbiakban Western blot analízishez használtuk, mely során anti-Nur77 (BD Pharmingen) and anti-RXR (Santa Cruz Biotechnology) antitesteket alkalmaztunk a fehérjék detektálására.

### **Bcl-2/BH3 domén intracelluláris jelölése**

A frissen izolált tímuszsejteket retinoidokkal vagy forbol-dibutiráttal (2,5 ng/ml) és 0,5  $\mu$ M ionomicinnel kezeltük. A kezelést követően a sejteket PBS-sel mostuk és centrifugáltuk 4°C-on 5 percig 4000 rpm-en. A pelletet fixációs/permeabilizáló pufferrel (BD Biosciences, USA) szuszpendáltuk, majd jégén tartottuk 30 percig. A sejteket ezután pufferrel mostuk, centrifugáltuk 4°C, 4000 rpm 5 percig. A sejteket Bcl-2/BH3domén specifikus antitesttel (Abgent, USA) jelöltük egy éjszakán át. Másodlagos antitestként FITC-konjugált nyúl IgG ellenes antitestet használtunk (Sigma-Aldrich, USA). A 2 órás inkubálás után a fölösleges antitesteket mostuk, PBS-ben feloldottuk a pelletet, majd áramlási citometriás (FACS Calibur, BD Biosciences) méréshez használtuk a mintákat. Az eredményeket WinMDI 2.9 szoftverrel értékeltük ki.

### **TNF $\alpha$ szint meghatározása timocita felülúszóból**

Vad típusú timocitákat  $5 \times 10^6/0,5$ ml koncentrációban 24-lyukú tenyésztőedényre szélesztettünk és sejteket különböző koncentrációjú retinsavakkal vagy forbol-dibutiráttal (2,5 ng/ml) és 0,5  $\mu$ M ionomicinnel kezeltük 18 órán keresztül. TNF $\alpha$  citokin szintjét a felülúszóban DuoSet Mouse TNF alpha ELISA Kit (R&D Systems) ELISA kit segítségével mértük.

### **A citokin termelés meghatározása**

Vad típusú és A<sub>2</sub>R hiányos BMDM makrofágokat 24-lyukú tenyésztőedényre tettünk ( $5 \times 10^5$  sejt/lyuk) és 200 ng/ml LPS-sel kezeltük 1 órán át. Egyes esetekben a sejteket A<sub>2A</sub>R-specifikus agonista CGS21680 (1  $\mu$ M, Tocris), A<sub>2A</sub>R specifikus antagonistá SCH442416 (10 nM, Tocris), JNK inhibitor TCS JNK 60 (100 nM), Rp-cAMPs (100  $\mu$ M) vagy forszolin (10  $\mu$ M) jelenlétében 1 óráig kezeltük elő. A makrofágok citokin termelődésének meghatározására a sejteket lemostuk az LPS kezelést követően, ahol szükséges a vegyületeket újra hozzáadtuk és a makrofágokat további 5 órán át inkubáltuk. A sejt felülúszó citokin tartalmát a különféle kísérletekben egér citokin array segítségével vizsgáltuk. A pixel sűrűséget az array egyes pontjában ImageJ szoftver segítségével

határoztuk meg. A MIP-2, TNF- $\alpha$ , IL-6 citokinek szintjét DuoSet Mouse TNF alpha ELISA Kit (R&D Systems) ELISA kit segítségével mértük.

### **MAPK foszforiláció meghatározása**

BMDM makrofágokat ( $1 \times 10^6$  sejt/lyuk) 200 ng/ml LPS-sel kezeltük egy órán keresztül. Egyes esetekben a sejteket 10 nM SCH442416 (10 nM, Tocris) alkalmazásával kezeltül elő 1 órán át. 1 h inkubáció után meghatároztuk humán foszfo-MAPK array segítségével a MAP kinázok és más szerin/reonin kinázok foszforilációjának relatív szintjeit. A pixel sűrűséget az array egyes pontjában ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg.

### **DUSP1 siRNA transzfekció**

BMDM makrofágokat egér DUSP1 ON-TARGETplus SMARTpool siRNS-el transzfectáltuk. Kontrollként ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool siRNS-t alkalmaztunk. A transzfectálásokat DharmaFECT 1 transzfectációs reagenssel végeztük, a gyártó által megadott protokoll alapján. siGLO Green (6-FAM) transzfectációs indikátort használtunk a sikeres reakció kimutatására. A makrofágokat 5 nappal a transzfectiót követően használtuk fel. A csendesítés hatékonyságát Western blot és QPCR technikával ellenőriztük.

### **CD4+CD8+ timociták izolálása**

4 hetes vad típusú egerekből frissen izolált timocitákat fikoeritrin konjugált-anti-CD4 és fluoreszcein izotiocianát-anti-CD8 antitestekkel (BD Biosciences) jelöltünk szobahőmérsékleten 10 percig. A dupla pozitív timocita populáció elkülönítését FACS Aria III készülékkel (BD Biosciences) végeztük. A sejthalál csökkentése érdekében a sortolást 4°C-on végeztük. Az eredményeket BD FACSDiva Version 6.1.3 szoftverrel értékeltük ki.

### **Statisztikai analízis**

A bemutatott eredmények legalább három, eltérő napon végzett, független kísérlet adatait mutatják be. A timocita értékek esetében a szignifikanciát kétszélű, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbával adtuk meg. A citokin array esetében pedig ANOVA tesztet használtunk. A  $p < 0.05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, melyet csillag jelöl.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A RETINOIDOK NUR77-FÜGGŐ APOPTÓZIST VÁLTANAK KI EGÉR TÍMUSZSEJTEKBE**

#### **Nur77 fokozott kifejeződése nélkülözhetetlen az egér timociták retinoid-kiváltotta apoptózisához**

Laborunkban folyó korábbi kutatások kimutatták, hogy az egér timociták kifejezik az RAR  $\gamma$  receptort, melynek aktiválásán keresztül az éretlen tímuszsejtek transzkripció-függő apoptózist váltják. Továbbá leírtuk, hogy perifériás T-sejteken és T-sejt hibridómákon az RAR $\gamma$  aktiválása a Nur77 fokozott kifejeződését eredményezi.

Első kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a T-sejt hibridóma sejtvonalhoz hasonlóan a retinoidok képes-e kiváltani a Nur77 indukcióját egér tímuszsejteken, melynek vizsgálatára 4 hetes egerek frissen izolált tímuszsejtjeit transz-retinsavval és 9-cisz-retinsavval kezeltem. Eredményeim azt mutatják, hogy a retinsavak fokozzák a Nur77 expresszióját mind fehérje, mind mRNS szinten. Ebben a folyamatban a 9cRA hatékonyabbnak bizonyult, ami azt jelentheti, hogy az RXR ligálása hozzájárulhat a Nur77 indukciójához.

Annak eldöntésére, hogy a Nur77 szerepet játszik-e a retinsavak által kiváltott apoptózis során, vad típusú és Nur77 hiányos timocitákat növekvő koncentrációban 9cRA-val és ATRA-val kezeltem. Azt tapasztaltam, hogy mindkét retinsav dózis-függő apoptózist váltott ki az egér timocitákban. Összhangban az ATRA kevésbé hatékony Nur77 indukáló képességével, az sejtihal kiváltásában is kevésbé effektívnek bizonyult. Mivel a Nur77 hiányos timocitákban az apoptózis kiváltása elmarad retinsav kezelés hatására, igazoltuk, hogy a retinoidok-kiváltotta sejtelhalás teljes mértékben Nur77-dependens folyamat. Meglepetésünkre azt találtuk, hogy a timociták spontán elhalása is Nur77-függően megy végbe. A kapott eredmények nem egy Nur77-függő fejlődési hiba következményei, hiszen nem figyeltük meg eltérést a Nur77 hiányos egerek tímuszainak tömegében és sejttözsztételében sem a vad típusú állatokhoz képest.

#### **A retinsavak indukálják a FasL, TRAIL, NDG-1, Gpr65 és a Bid kifejeződését, melyek hozzájárulnak az apoptózis elindításához**

Ezt követően szerettük volna megtudni, hogy melyek azok a gének, ami a retinsavak által kiváltott apoptózist közvetítik. A 9cRA által kiváltott génexpressziós változásokat mikroarray segítségével jellemeztük. Igazoltuk, hogy a Nur77 kifejeződése szignifikánsan megemelkedett 9cRA hatására, míg a másik két Nur77 családtag (Nor-1 és Nur1) expresszióját nem befolyásolta a retinsav kezelés. Kíváncsiak voltunk, hogy az a retinoid-indukálta sejtelhalás során melyek azok az apoptózishoz kapcsolható gének, melyek kifejeződése Nur77-függően változott. Azonosítottunk 8 retinoid-indukált apoptózisban szerepet játszó gént, melyek többsége Nur77-függő módon

expresszálódott. Ezek között szerepel a már ismert Nur77-függő gén, az NDG-1 mellett 2 új gén, melyek kifejeződését a Nur77 transzkripciós faktor szabályozza: egy „csak BH3” fehérje, a Bid és a pH érzékelő receptor Gpr65. Eredményeink igazolására RT-QPCR technikával is meghatároztuk mRNS szintjüket, valamint megnéztük a FasL és TRAIL (korábban leírt Nur77 targetek) kifejeződését is. Adataink azt mutatták, hogy vad típusú timocitákban 4 órás ATRA és 9cRA kezelés hatására minden vizsgált gén expressziója fokozódott, míg a Nur77 hiányos tímuszsejtekben ez elmaradt. A 9cRA hatékonyabban indukálta a Nur77-függő gének kifejeződését, mint az ATRA kezelés.

### **A kaszpáz-8 aktiválása hozzájárul a retinoid-kiváltotta sejthalás elindításához**

A retinsavak indukálták két sejthalál receptor ligand, (FasL, TRAIL) és az NDG-1 kifejeződését, melyek együttesen hozzájárulnak a kaszpáz-8 aktiválásához. Ezért a következő lépésben megvizsgáltuk a kaszpáz-8 aktiválódását és szubsztrátjának, a retinoidok által szintén indukált Bid fehérjének a hasítását. Megállapítottuk, hogy a retinsavak a kaszpáz-8 korai aktiválását váltják ki, amit időben gyorsan követ a Bid hasított formájának megjelenése, ami specifikus kaszpáz-8 inhibitor (z-IETD-fmk) alkalmazva gátolható. Annak kiderítésére, hogy a kaszpáz-8-nak milyen szerepe van a retinoidok által kiváltott apoptózisban, specifikus inhibitorral aktivitását blokkoltuk. Az z-IETD-fmk előkezelés szignifikánsan csökkentette, de nem gátolta teljes mértékben a retinsav-indukálta sejthalást. Hasonló eredményt láhattunk dexametazon kezelt timociták esetében is, ahol a kaszpáz-8 gátlása kisebb blokkoló hatást mutatott, mivel a glükokortikoid-kiváltott apoptózis során a kaszpáz-9 a meghatározó iniciátor kaszpáz. Ugyanakkor a Jo2 (Fas receptor aktiváló antitest) kezelés apoptózist kiváltó hatását a kaszpáz-8 inhibitor teljesen megszüntette. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a kaszpáz-8 ugyan hozzájárul a retinoid-indukálta apoptózishoz, de a folyamat csak részben függ az aktivitásától.

### **A kaszpáz-9 meghatározó szerepet tölt be a retinsavak által indukált apoptózisban**

A timociták az I. típusú sejtek csoportjába tartoznak, melyekben a sejthalál receptorok, pl. Fas által aktivált kaszpáz-8 elegendő kaszpáz-3-at eredményez az apoptózis fenntartásához, így nincs szükség a mitokondriális út bekapcsolására. Ez a folyamat kaszpáz-9-et nem igényel. Azonban felmerült bennünk a kaszpáz-9, tehát a mitokondriális út esetleges részvétele a retinoid-kiváltott apoptózisban. Míg a kaszpáz-9 specifikus inhibitornak (z-LEHD-fmk) nem volt hatása a Fas-indukált apoptózisra, addig teljesen visszaszorította a retinoid- és dexametazon-kiváltotta sejthalált. A fenti eredményekkel összhangban kimutattuk a kaszpáz-9 aktiválódását is. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a retinoidok sejthalált kiváltó hatásában a kaszpáz-8 iniciátor szerepet tölt be, de fenntartásához és közvetítéséhez szükség van a mitokondriális útvonal.

**A Gpr65 által közvetített szignálút nem szükséges a retinoid-kiváltotta apoptózishoz**

A Gpr65 egy Gs-fehérje kapcsolt, pH szenzorként funkcionáló receptor. Korábbi tanulmányok leírták, hogy aktiválása az adenilát-cikláz enzimen keresztül a celluláris cAMP szint növekedését és a cAMP/protein kináz A útvonal elindítását eredményezi, ami apoptózishoz vezethet egyrészt a TNF $\alpha$  termelődés, másrészt a pro-apoptotikus Bim szabályozása révén. Mivel a 9cRA fokozza a Gpr65 expresszióját, ellenőrizni kívántuk, hogy a retinsavak befolyásolják-e TNF $\alpha$  mennyiségét. Sem mRNS szinten RT-QPCR-ral, sem pedig fehérje szinten ELISA módszerrel nem tudtuk kimutatni a citokin emelkedett szintjét. Így a továbbiakban teszteltük a Bim kifejeződését is retinsav kezelés hatására. Ugyan sikerült kimutattunk annak fokozódását, de ez a növekedés nem volt befolyásolható specifikus cAMP-függő protein kináz I and II inhibitorok (Rp-cAMP vagy H89) alkalmazásával. Összességében eredményeink azt mutatják, hogy bár a Gpr65 kifejeződése fokozódik, a retinoid-kiváltotta apoptózis során a savasodás mértéke nem éri el az aktiválásához szükséges értéket. Meglepetésünkre a Bim expressziójának változását is Nur77-függőnek találtuk.

**Bim STAT1 függő módon indukálódik a retinoid-mediálta timocita apoptózis során és hozzájárul a sejthalál kiváltásához**

Korábbi kutatások igazolták, hogy a STAT1 transzkripció faktor is szabályozhatja a Bim expresszióját az egér timocitákban. Affymetrix adataink azt mutatták, hogy a STAT1 kifejeződése megnőtt a retinoid-kiváltotta sejtelhalás során, melyet Western blot technikával igazoltunk fehérje szinten is. Munkánk következő szakaszában STAT1 hiányos timociták segítségével arra kerestünk választ, hogy a STAT1 felelős-e a Bim megnövekedett kifejeződéséért. Bemutattuk, hogy a STAT1 hiánya a BIM indukció elmaradását és a retinoid kiváltotta sejthalál mértékének szignifikáns csökkenését eredményezte.

**Nur77 a mitokondriumba transzlokálódik a retinoid-kiváltotta apoptózis során, ami a BCL-2/BH3 doménjének kifordulásához vezet**

Irodalomból ismert, hogy a negatív szelekció során a Nur77 képes a mitokondriumba bejutni, ahol kölcsönhat az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjével, mely konformáció változáshoz vezet és kiszabadítja annak BH3 doménjét, ami proapoptotikus jelleget ad a fehérjének. Ez alapján felvetettük annak a lehetőségét, hogy a retinoid által kiváltott apoptózis során is megjelenik Nur77 a mitokondriumban. Kontrollként a negatív szelekció jelátviteli útvonalát mimikáló forbol-dibutirát (PdBu)/Ionomycin (Iono) kettős kezelést alkalmaztunk. A PdBu/Iono kezelt sejtekben idő-függő Nur77 transzlokációt figyeltünk meg. Ebben az esetben a Nur77 erős foszforiláltságot mutatott. 9cRA kezelés és kevésbé hatékonyan, de az ATRA is indukálta a Nur77 idő-függő megjelenését a mitokondriumban. Mindkét esetben a maximális transzlokáció 2 óránál volt megfigyelhető. A

retinsav kezelés hatására transzlokálódó Nur77 sávja lényegesen kisebb, mint a PdBu/Iono kezelt minta esetében, ami a kisebb mértékű foszforilációval vagy a foszforiláció hiányával magyarázható.

Ezután megnéztük, hogy a transzlokáció vezethet-e a Bcl-2 előbb említett konformáció változásához. A BH3 domén általában a Bcl-2 fehérjén belül helyezkedik el és Bcl-2/BH3 domén specifikus antitestek számára nem hozzáférhető, így a domén megjelenése korrelál a fehérje pro-apoptotikus aktivitásával. A PdBu/Iono kezeléshez hasonlóan, ami ebben az esetben is pozitív kontrollként használt, a retinsavak is kiváltják a Bcl-2/BH3 doménjének felszínre kerülését, melynek mértéke a 9cRA hatására fokozottabb. Adataink igazolták, hogy a domén kifordulás valóban Nur77-függően megy vége, mivel a Nur77 hiányos timocitákban nem detektálható.

### **A retinoidok indukálják mind a Nur77-függő transzkripciót, mind a Bcl-2/BH3 domén megjelenését a DP timocitákban**

Korábbi tanulmányok szerint a retinoidok elsődlegesen a dupla pozitív sejtekre hatnak, azonban a Nur77 alap expressziós szintje a timociták differenciálódása során változik. Noha a dupla pozitív timocitákban a Nur77 kifejeződése csak kismértékű, mind a pozitív, mind a negatív szelekció során indukálódnak, melynek mértékét a T-sejt receptor szignál erőssége szabja meg. Kísérleteinket nem szeparált timocitákon végeztük, így annak eldöntésére, hogy a megfigyelt jelenség valóban a dupla pozitív timocitákra jellemző sejthalál forma, szortolás segítségével elkülönítettük a CD4/CD8 pozitív timocita populációt. Kimutattuk, hogy a DP timociták expresszálták a Nur77-et és a 9cRA valamint a PdBu/Iono kezelés fokozta kifejeződésüket. Mivel a szortolással kinyert sejtek száma limitált, csak a 3 retinoid-indukált, Nur77-függő gén mRNS szintjét ellenőriztük, melyek mindegyike megemelkedett retinsav kezelés hatására. A Bcl-2/BH3 domén megjelenésének vizsgálatakor a sejteket a retinsav kezelést követően CD8 ellenes és Bcl-2/BH3 domén specifikus antitestekkel jelöltük, ebben az esetben a CD8 pozitív sejtek többsége a DP timocitának felelt meg. Eredményeink igazolták a Nur77 mitokondriális transzlokációját. Továbbá teszteltük a kaszpáz-8 és -9 szerepét is a dupla pozitív sejtek esetében is, ahol a nem szortolt sejtekhez hasonlóan mindkét inhibitor gátolta a retinoid-kiváltotta apoptózist.



## **4.2. AZ ADENOZIN A<sub>2A</sub> RECEPTOR JELÁTVITEL A DUSP1 EXPRESSZIÓJÁNAK FOKOZÁSÁN KERESZTÜL CSÖKKENTI AZ EGÉR MAKROFÁGOK LPS-INDUKÁLTA GYULLADÁSI CITOKIN TERMELÉSÉT**

### **Az adenosin A<sub>2A</sub> receptor egy feedback szabályozó mechanizmuson keresztül csökkenti a LPS indukálta gyulladási citokin termelést csontvelői makrofágokban**

Korábbi kutatások kimutatták, hogy LPS kezelésnek kitett makrofágokban nő az A<sub>2A</sub> receptorok kifejeződése. Első kísérleteinkben igazoltuk, hogy LPS stimulus valóban indukálta az A<sub>2A</sub>R kifejeződését a csontvelői makrofágok felszínén és mRNS szinten is.

Ezután arra voltunk kíváncsiak, hogy az A<sub>2A</sub>R-nak van-e szerepe az LPS indukálta gyulladási citokin termelés szabályozásában. Ennek eldöntésére vad típusú és A<sub>2A</sub> receptor hiányos makrofágokat kezeltünk LPS-sel (1 óra). Citokin termelésük meghatározása a felülűszóból egy igen érzékeny módszer, a citokin array segítségével történt további 5 óra elteltével. Eredményeinkből látható, hogy az A<sub>2A</sub> receptor hiánya jelentős befolyásolta a nyugalomban lévő makrofágok gyulladási citokin termelését: az A<sub>2A</sub>R hiányos makrofágokban emelkedett volt a B limfocita kemoattraktáns (BLC), interferon (IFN)- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ -indukált protein-10 (IP-10), keratinocita kemoattraktáns (KC) and mátrix metalloproteináz szöveti inhibitor-1 (TIMP)-1 mennyisége. Irodalmi adatoknak megfelelően az LPS stimulálta a csontvelői makrofágok gyulladási citokin termelését, melyek termelését az A<sub>2A</sub>R hiánya tovább fokozta. A citokin array eredményeink megerősítésére a TNF- $\alpha$ , IL-6 and MIP-2 fehérje és mRNS szintjét ELISA és RT-QPCR technikával is meghatároztuk. Mindkettő igazolta, hogy a vizsgált citokinek termelődése LPS kezelés hatására megemelkedett a receptor hiányos makrofágokban a vad típusú sejtekhez képest. Adataink összhangban állnak azokat a korábbi tanulmányokkal, melyek szerint az LPS-nek kitett makrofágok endogén adenzint termelnek, ami az A<sub>2A</sub>R-on keresztül szabályozza az LPS-kiváltotta gyulladási citokin termelést.

### **Az A<sub>2A</sub> receptorok hiánya nem befolyásolja az LPS-indukálta NF- $\kappa$ B jelátviteli utat**

LPS-indukálta jelátviteli utak részben az NF- $\kappa$ B aktiválásán keresztül mediálják a gyulladási citokinek termelődését. Ezek a jelátviteli utak fokozzák az NF- $\kappa$ B-t negatívan szabályozó I $\kappa$ B $\alpha$  fehérje degradációját. Ennek megfelelően meghatároztuk az I $\kappa$ B $\alpha$  szintjét vad típusú és A<sub>2A</sub>R hiányos makrofágokban LPS aktivációt követően. Sem az I $\kappa$ B $\alpha$  mennyiségében, sem pedig az LPS-kiváltotta degradáció kinetikájában nem találtunk különbséget a két makrofág típus között. Hasonló eredményt kaptunk az A<sub>2A</sub>R agonistával (CGS21680) végzett kísérletek esetében.

NF- $\kappa$ B dimerként funkcionáló transzkripciós faktor, a legtöbb sejttypusban p50/p65 heterodimer formában van jelen, ezért következő lépésként vizsgáltuk, hogy az A<sub>2A</sub>R jelátvitel befolyásolja-e a

p50/p65 NF- $\kappa$ B alegységek sejtmagi lokalizációját Ennek vizsgálata TransAM NF- $\kappa$ B transzkripció Kít segítségével történt. Nem találtunk különbséget a transzkripció faktorok sejtmagi lokalizációjában sem nyugvó, sem LPS-stimulált körülmények között a vad típusú és receptor hiányos makrofágokban, melyet A<sub>2A</sub>R agonista (CGS21680) jelenléte sem befolyásolt. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy az NF- $\kappa$ B útvonal adozin jelenlétében is megfelelően aktiválódik és nem ez a fő jelátviteli út, amin keresztül az A<sub>2A</sub>R csökkenti a gyulladási citokin képződését.

### **Az adozin az A<sub>2A</sub> receptoron keresztül hatva csökkenti az alap és LPS-kiváltotta JNK aktivitást**

Mivel A<sub>2A</sub>R jelátvitel nem befolyásolta az LPS/TLR4 komplexről induló NF- $\kappa$ B aktivációt, ezért megvizsgáltuk a MAPK útvonalat. A vad típusú és A<sub>2A</sub>R hiányos csontvelői makrofágok nyugvó és LPS-indukálta MAPK aktivitásának összehasonlítására foszfo-MAP kináz array kitet használtunk, amely lehetővé teszi a MAP kinázok és számos kapcsolódó fehérje foszforilációjának relatív szintjeinek párhuzamos meghatározását. Megfigyeltük, hogy az A<sub>2A</sub>R hiánya fokozta a p38 $\alpha$ , c-Jun N-terminal kináz (JNK) és extracelluláris szignál-regulált kináz (ERK) 2 kinázok alap foszforilációját. 1 órás A<sub>2A</sub>R antagonistá (SCH442416) kezelés részben hasonló eredményt adott. Ez azt mutatja, hogy az A<sub>2A</sub>R folyamatos aktiválása szükséges a nem stimulált sejtekben.

Megfigyelhető, hogy vad típusú makrofágokban az LPS-stimuláció fokozza a p38, ERK2 és JNK foszforilációját valamint a p38 jelátvitel további tagjainak foszforilációját (RSK 1/2, MSK2). Korábbi kutatásokból ismert, hogy a p38 szeletíven aktiválja a MAPK aktivált protein kináz 2-t, ami foszforilálja a cAMP válasz elem kötő faktort (CREB), melyet szintén sikerült igazolni az array segítségével. Ezenkívül sikerült kimutatni a foszfatinilozitol-3 kináz útvonal elemeinek foszforilációját is, melyek az NF- $\kappa$ B magi transzlokációját gátolva limitálják az LPS-mediált jelátviteli utakat.

Az A<sub>2A</sub>R hiánya vagy gátlása a p38 $\alpha$  and ERK2 fokozott alap foszforilációját eredményezte, azonban LPS stimulus hatására a foszforiláció tovább nem fokozható az A<sub>2A</sub>R jelátvitel hiányában. Ennek ellenére a foszforilációjuk szintje még mindig magasabb volt, mint a vad típusú sejtekben LPS kezelést követően. Ezzel ellentétben LPS kezelés hatására JNK kinázok foszforilációja szignifikánsan nagyobbak bizonyult az A<sub>2A</sub> receptor hiányos makrofágokban.

Mivel a makrofágok a JNK1-et és JNK2-t is expresszálják és a foszfo-MAP-kináz array nem detektálja az egér JNK1-et, így Western blot technikával specifikus egér JNK1 ellenes antitest segítségével vizsgáltuk foszforilációs státuszát. Az A<sub>2A</sub>R hiányos makrofágokban a LPS kezelést követően a JNK1 megnövekedett foszforilációját detektáltuk. Eredményeinket foszfo-pánJNK

fehérje kimutatására alkalmas ELISA módszerrel is megerősítettük. A fenti adatok arra engednek következtetni, hogy az A<sub>2A</sub>R jelátvitel negatívan befolyásolja a JNK aktivitást.

### **Adenozin jelátvitelben a JNK játssza a fő szerepet a LPS-indukálta gyulladási citokin termelés szabályozásában**

Ha feltételezzük, hogy az A<sub>2A</sub>R jelátvitel az LPS-indukálta gyulladási citokin termelést a JNK foszforiláción keresztül befolyásolja, akkor a JNK kinázok gátlásának hatással kell lennie az adenozin gyulladási citokin termelődést szabályozó képességére. Azt találtuk, hogy vad típusú makrofágokban a A<sub>2A</sub>R agonista (CGS21680) csökkentette, míg az A<sub>2A</sub>R antagonistája (SCH442416) fokozta az LPS-indukált IL-6, MIP-2 és TNF $\alpha$  termelődést. Ezek a vegyületek nem befolyásolták az A<sub>2A</sub>R hiányos makrofágok LPS-indukálta gyulladási citokin. A JNK aktivitásának gátlása TCS-JNK inhibitorral ugyanolyan mértékben csökkentette az LPS-indukálta gyulladási citokin termelést a vad típusú sejtekben, mint a receptor hiányos makrofágokban. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a JNK az adenozin/A<sub>2A</sub>R jelátviteli út fő „downstream” eleme.

### **Az A<sub>2A</sub> receptor jelátvitel az adenilát-ciklázon keresztül fokozza az alap és LPS-indukálta DUSP1 expressziót**

A MAPK-ok fokozott foszforilációja az A<sub>2A</sub>R hiányos makrofágokban vagy az „upstream” ható, őket aktiváló kinázok nagymértékű aktivációjából ered, vagy az őket kikapcsoló, foszfát csoportjaikat eltávolító specifikus foszfatázok csökkent aktivitásából fakadhat. A következő lépésben tehát megnéztük, hogy az őket aktiváló MKK4 és MKK3/6 LPS-indukált foszforilációja változik-e A<sub>2A</sub>R hiányában. A JNK1 aktivációban szerepet játszó MAPK kinázok LPS hatására bekövetkező foszforilációját az A<sub>2A</sub>R jelátviteli út nem befolyásolta, amit Western blot technikával támasztottunk alá. Ezen adataink alapján elmondható, hogy a nem az upstream kinázok fokozott aktiválódása a felelős az A<sub>2A</sub>R hiányában megfigyelhető megnövekedett MAPK foszforilációért.

Irodalomból ismert, hogy a kettős specificitású foszfatázok (DUSP-ok) meghatározott Tyr és Thr oldallánccokat érintő defoszforiláción keresztül inaktívválik a MAPK-okat. A makrofágokban expresszálódó DUSP-ok közül LPS/TLR4 interakciót követően a DUSP1 mutatja a legerősebb aktivitást. A DUSP1 központi szerepet tölt az immunválaszok szabályozásában a p38 és a JNK MAPK defoszforilációja révén. Vizsgálatára irányuló kísérleteink első részeként meghatároztuk a DUSP1 expresszióját vad típusú és illetve A<sub>2A</sub>R hiányos makrofágokban. A<sub>2A</sub> receptor hiányában a DUSP1 kifejeződése szignifikánsan lecsökkent. Vad típusú makrofágokban A<sub>2A</sub>R antagonistája (SCH442416) hatására a DUSP1 csökkent szintet mutatott mind mRNS, mind fehérje szinten, míg az A<sub>2A</sub>R agonista (CGS21680) növelte a DUSP1 kifejeződését.

Korábbi tanulmányok szerint maga az LPS stimuláció fokozza a DUSP1 génátírását, ami hozzájárul a LPS válasz féken tartásához. Feltételeztük, hogy az A<sub>2A</sub>R jelátvitel befolyásolja az LPS-

szabályozott DUSP1 megjelenését, ezért  $A_{2A}R$  agonista és antagonistá előkezelést (1óra), majd további 2 óra LPS-kezelést követően meghatároztuk a DUSP1 mennyiségét. Az tapasztaltuk, hogy nem csupán az alap, de az LPS-re indukálódó DUSP1 szintje is magasabb volt a vad típusú makrofágokban az  $A_{2A}R$  hiányos sejtekhez képest valamint a vad típusú sejtekben az agonista felmerte, az antagonistá pedig csökkentette a DUSP1 mRNS szintjét.

Korábbi kutatásokról ismert, hogy  $A_{2A}$  receptornak az LPS jelátvitelre gyakorolt hatását a megemelkedett intracelluláris cAMP szint közvetíti. Annak vizsgálatára, hogy a cAMP szintben történő változások hogyan befolyásolják a DUSP1 mRNS szintjét, a makrofágokat egy adenilát-cikláz aktivátorral, a forskolinnal, valamint Rp-cAMP-vel kezeltük (1 óra), ami az endogén cAMP kompetitív inhibitora. A forskolin emelte mind az alap, mind pedig az LPS-kiváltott DUSP1 expressziót a vad típusú és receptor hiányos makrofágokban egyaránt, míg az Rp-cAMP csökkentette a DUSP1 mRNS szintjét, de kizárólag a vad típusú makrofágokban. Mindezek arra engednek következtetni, hogy a  $A_{2A}R$  az adenilát-cikláz útvonal aktiválásán keresztül szabályozza a DUSP1 mRNS szintjét nyugvó és LPS-nek kitett makrofágokban egyaránt.

#### **A DUSP1 hiányában nem érvényesül az $A_{2A}R$ jelátvitel JNK1 foszforilációt csökkentő hatása**

Hogy a DUSP1 szerepét vizsgáljuk ebben a folyamatban, DUSP1 géncsökkentést végeztünk vad típusú és  $A_{2A}R$  hiányos makrofágokban, melynek hatékonyságát fehérje szinten Western blotlalt, mRNS szinten RT-QPCR-rel igazoltunk. A DUSP1 hiányában fokozottabb alap és LPS-indukált JNK foszforilációt láttunk a vad típusú makrofágokban. Receptor hiányos makrofágokban a DUSP1 csökkent szintje csak kis mértékben befolyásolta a JNK fokozott foszforilációját. Adataink azt mutatják, hogy az  $A_{2A}R$  és a belőle induló jelátvitel a DUSP1 foszfatáz expresszióját módosítva szabályozza a JNK1 foszforilációt.

#### **A DUSP1 hiányában nem érvényesül az $A_{2A}R$ jelátvitel gyulladási citokin termelést (IL-6, TNF $\alpha$ ) csökkentő hatása**

A DUSP1 további szerepét karakterizálva, megnéztük a DUSP1 géncsökkentés gyulladási citokin képződésre gyakorolt hatását vad típusú és  $A_{2A}R$  hiányos makrofágokban. Vad típusú makrofágok a DUSP1 csökkentésére az LPS kezelésre indukálódó gyulladási citokinek fokozott termelésével válaszolnak és az DUSP1 csökkentett sejtek érzéketlenné váltak az  $A_{2A}R$  jelátvitelre.  $A_{2A}R$  hiányos makrofágokban a DUSP1 csökkentése csak kis mértékben befolyásolta a LPS-stimulusra bekövetkező gyulladási citokin képződést. Ez arra utal, hogy az  $A_{2A}R$  és a belőle induló jelátvitel a DUSP1 foszfatáz szintjének szabályozása révén tartja kordában az LPS-indukált gyulladási citokinek keletkezését.

## 5. MEGBESZÉLÉS

Az immunrendszer fő funkciója a patogén mikrobák, toxikus vagy allergén fehérjék gyors eltávolítása a saját szövetek károsítása nélkül, ami a veleszületett és az adaptív immunitás együttes működése révén valósul meg. A veleszületett és adaptív immunitás általában egymásra épülve működik: a szervezet első védelmi vonalát a veleszületett immunrendszer biztosítja, amely érzékeli a veszélyt, ugyanakkor nélkülözhetetlen szerepe van az adaptív immunválasz aktiválásában, mely fontos védelmet biztosít a patogénnel szemben és lehetővé teszi az immunológiai memória kialakulását.

A T-sejtek által közvetített adaptív immunválasz fő biológiai funkciója a fertőzött sejtek azonosítása és elpusztítása valamint a patogénekből származó peptidok MHC-molekulákhoz kötött formájában történő felismerése. Éppen ezért a megfelelő T-sejt repertoár kialakulása a tímuszban egy igen jól szabályozott folyamat. A tímuszban zajló differenciálódásuk során a fejlődő T-limfociták kevesebb, mint 5%-a él túl a szigorú szelektációs folyamatoknak köszönhetően. A dupla pozitív sejtek 90%-a olyan T-sejt receptorral rendelkezik, melyek nem képesek felismerni az MHC- fehérje komplexeket és neglekciónak elhalnak. Az elhalt apoptotikus sejtek gyors eltávolítását a tímikus makrofágok végzik, melyek válaszul szolubilis mediátorokat, például retinoidokat és adozint bocsátanak ki. Ennek következtében úgy feltételezzük, hogy az apoptotikus sejteket bekebelező tímikus makrofágok folyamatosan biztosítják ezeknek az efferocitózis-függő mediátoroknak a termelését, ezáltal hozzájárulnak egy olyan tímikus környezet kialakításához, ami megfelelő T-sejt receptor jel hiányában lehetővé teszi a fejlődő sejtek gyors neglekciónak. Laborunk korábbi eredményei igazolták, hogy a tímociták expresszálják az RAR $\gamma$  receptort, melynek aktiválásán keresztül transzkripció-függő sejtelhalást váltanak ki az éretlen tímuszsejtekben. Azonban retinoidok által közvetített apoptotikus folyamatot még nem karakterizálták. Munkám során azt vizsgáltam, hogy a retinoidok milyen lehetséges mechanizmus révén képesek kiváltani az éretlen tímuszsejtek apoptózisát.

Jurkat T-sejt vonalon végzett korábbi kutatások kimutatták, hogy a T-sejt receptor jelátvitelhez hasonlóan a retinoidok is képesek kiváltani a Nur77 transzkripció faktor indukálását. Bizonyítottuk, hogy a retinsavak a tímocitákban is fokozzák a Nur77 expresszióját és a retinoid-kiváltotta sejtelhalás teljes mértékben függ a Nur77 jelenlététől. Irodalmi adatok alátámasztják a Nur77 döntő szerepét a T-sejt receptoron (TCR) keresztül kiváltott apoptózis, a negatív szelekció jelátvitelét reprezentáló modell esetében is, ugyanakkor leírták, hogy a Nur77 hiánya nem befolyásolja a TCR-mediált sejtelhalást. Ez a megfigyelés azzal magyarázható, hogy a T-sejt receptor szignálok a Nur77 családba tartozó Nor-1 expresszióját is egyidejűleg kiváltották, melynek génterméke a Nur77-tel átfedő funkcióval bír. Meglepetésünkre, a T-sejt receptor jelátviteltől eltérően a retinoidok nem

indukálták a többi Nur77 családtag megjelenését az elhaló timocitákban. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a bár a Nur77 és Nor-1 hasonló, részben átfedő biológiai szerepet tölt be, eltérő szignálok által szabályozódnak. Eredményeink továbbá azt mutatták, hogy mind a 9cRA, mind az ATRA kiváltotta a Nur77 fokozott kifejeződését az egér timocitákban. Ebben a folyamatban a 9cRA hatékonyabbnak bizonyult utalva arra, hogy az RXR ligálása hozzájárulhat a Nur77 indukciójához. A Nur77 nagyobb mértékű kifejeződésével összhangban a 9cRA fokozottabb sejthalál kiváltására képes a timocitákban.

Azonosítottunk 8 retinoid-indukált apoptózisban szerepet játszó gént, melyek többsége Nur77-függő módon expresszáldott. A FasL, TRAIL és NDG-1 génekről már korábban ismert volt, hogy az apoptózis folyamatát közvetítő Nur77 célgénnek, melyek együttesen hozzájárulnak a kaszpáz-8 aktiválásához. Sikerült azonban meghatározni 4 új Nur77-függő gént a timocitákban a retinoid indukált sejthalál során: a csak BH3 fehérje Bid, a pH érzékelő receptor Gpr65, egy másik csak BH3 fehérje, a Bim és végül a Ptpn6 foszfatáz.

Kísérleteink során sikerült kimutatni a kaszpáz-8 aktiválódását, valamint a szubsztrátja, a Bid regulátor molekula hasítását. Kaszpáz-8 specifikus inhibitor jelenlétében végzett kísérleteink esetében azt tapasztaltuk, hogy a kaszpáz-8 gátlása során a retinsav által kiváltott sejtelhalás mértéke szignifikánsan lecsökkent, ami arra utal, hogy a retinoidok sejthalált kiváltó hatásában a kaszpáz-8 meghatározó szerepet tölt be. Bár a timociták az un. I-es típusú sejtekhez sorolhatók a Fas-mediált apoptózis tekintetében, adataink, melyek azt mutatták, hogy a kaszpáz-9 gátlása is megakadályozza a retinoidok által kiváltott timocita sejtelhalást, azt sugallják, hogy a retinoid-kiváltotta apoptózis fenntartásához és közvetítéséhez a kaszpáz-8 mellett szükség van a mitokondriális útonalban szerepet játszó kaszpáz-9-re is.

A mitokondriális apoptotikus út jelentőségét tovább bizonyítja, hogy a retinoidok indukálták a STAT1 transzkripciósi faktort, ami a pro-apoptotikus BH3-domén fehérjék közé tartozó Bim fokozott kifejeződéséhez vezetett. A STAT1 hiánya a BIM indukció elmaradását és a retinoid kiváltotta sejthalál mértékének szignifikáns csökkenését eredményezte. Érdekes módon más sejttípusokban is leírták, hogy a retinsav hatására nő a STAT1 expressziója és foszforiláltsági szintje, ami azt jelzi, hogy a STAT1 nem egyedül elem a retinoid jelátvitelnek a tímuszsejtekben. Emellett azt találtuk, hogy az elhaló timocitákban a transzglutamináz 2 enzim is retinoid függően - de Nur77-től független módon - regulálódik, amiről korábban leírták, hogy mitokondriumban hatva hozzájárul az apoptózis program elindításához.

A Nur77 fehérjéről ismert, hogy transzkripciósi aktivitásától függetlenül is hozzájárul az apoptózis kiváltásához közvetlenül a mitokondriumban hatva. Kimutattuk, hogy a Nur77 fehérje a retinsav kiváltotta apoptózis során is megjelenik a mitokondriumban. A mitokondriális transzlokáció kinetikája hasonló a T-sejt receptor-mediált sejtelhalás során megfigyelt mintával. Irodalmi adatok

azt mutatják, hogy a TCR- közvetített apoptózis során a Nur77 egy protein kináz C által erősen foszforilált formában jelenik meg a mitokondriumban, azonban a retinsavak által kiváltott apoptózis során nem figyelhető meg ez a fokozott foszforilációs mintázat. Meglepetésünkre a 9cRA hatékonyabban indukálta a transzlokációt annak ellenére, hogy korábbi tanulmányok szerint az RXR ligálása megakadályozza a Nur77 mitokondriumba jutását, azonban ezekben a kísérletekben egy másik, protein kináz C-t aktiváló apoptózis szignál is jelen volt. Tehát a Nur77 mitokondriális megjelenésére egyidejűleg hatással lehet foszforilációs státusza és RXR ligand jelenléte. A Nur77 mitokondriális transzlokációja korrelál a Bcl-2 pro-apoptotikus BH3 doménjének megjelenésével.

Mivel a kísérleteink nagy többségét nem szortolt timocitákon végeztük, kísérletsorozatunk néhány fő elemét megismételtük csak dupla pozitív, szortolt tímuszsejtek felhasználásával. Eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy a retinoidok egy Nur77-függő sejthalál programot indítanak el a dupla pozitív eger timocitákban, amiben közreműködnek a már ismert és újonnan azonosított Nur77-függő elemek, melyek együttesen hozzájárulnak a mitokondriális apoptotikus út elindításához.

Munkacsoportunk és más laborok kutatásai rávilágítottak, hogy a tímuszban jelen lévő sejtek egy része képes retinoid termelésre, ezáltal egy endogén retinoidokban gazdag szöveti környezet kialakítására. Nemrégiben meghatároztuk, hogy a retinsavak termelése a tímuszban keletkező apoptotikus sejtek eltávolítását végző makrofágokhoz köthető, azonban meglepetésünkre egyetlen klasszikus retinsav jelenlétét sem sikerült kimutatni, viszont a retinol-szaturáz útvonal metabolitjainak termelődését igen. Adataink arra utalnak, hogy *in vivo* a tímusz kéregállományában az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok által termelt, újonnan azonosított retinoidok hozzájárulhatnak az éretlen timociták apoptózisának szabályozásához.

A makrofágok képezik a veleszületett immunrendszer első védelmi vonalát, melyek egyrészt a patogének felismerésével és bekebelezésével járulnak hozzá a szervezet védelmi mechanikusához, másrészt a bakteriális komponensekre válaszul számos biológiailag aktív molekulát (citokint, kemokint) termelnek, melyek gyulladást váltanak ki és nagy számban vonzanak neutrofileket és monocitákat a gyulladás helyére. Bár a patogének elleni hatékony immunválasz elengedhetetlen része bizonyos fokú gyulladás, a gyulladási folyamat szabályozásának hiánya szöveti károsodáshoz, a szervi működés elégtelenségéhez, sokkhoz és végül halálhoz vezet. Ennek elkerülésére az immunrendszer számos olyan mechanizmust épített ki, ami pontosan szabályozza a gyulladás folyamatát. Ide tartozik a negatív szabályozó molekulák felszabadítása, pl. az adenzin.

Laboratóriumunkban nemrég kimutatták, hogy az apoptotikus sejtek fagocitózisa során az elhaló sejtekből felszabaduló adenin nukleotidokat a makrofágok felszínén lévő extracelluláris enzimek adenzinná alakítják. A tímuszban az apoptotikus sejteknek folyamatosan kitett makrofágok által

termelt adenzin - a retinoidokhoz hasonlóan - hozzájárul a tímociták neglektációval történő elhalásához. Nemcsak a tímuszban, hanem gyulladási környezetben is masszív apoptózis figyelhető meg, ahol a neutrofilek feladatuk végeztével apoptózissal halnak el. Laborunkban folyó kutatások kimutatták, hogy az apoptotikus sejtlevétel során az adenzin az  $A_{2A}$ R jelátviteli útján keresztül egyik oldalról citokin-specifikus módon részt vesz a gyulladási válasz lecsendesítésében, másrészt a neutrofil kemoattraktáns MIP-2 szabályozásán keresztül meghatározza a neutrofilek gyulladás helyére történő toborzását.

Továbbá jól ismert, hogy adenzin az adenzin  $A_{2A}$  receptorokon keresztül gátolni képes a makrofágok LPS-indukálta gyulladási citokin termelését. Ennek ellenére, hogy az adenzin gyulladáscsökkentő hatása az LPS-indukálta gyulladási citokin termelésre már hosszú ideje ismert, a háttérben álló pontos mechanizmust még nem tárták fel. Disszertációm második részében azt a molekuláris jelátviteli utat vizsgáltam, amin keresztül az adenzin befolyásolni képes az LPS jelátviteli utat egér makrofágokban. Eredményeink igazolták a korábbi tanulmányokat, mi szerint az adenzin gyulladáscsökkentő hatása az  $A_{2A}$  receptor aktiválásán keresztül valósul meg.

.....Korábban úgy vélték, hogy az  $A_{2A}$  receptor aktiválás az LPS-indukálta gyulladási mediátorok expresszióját az intracelluláris cAMP szint növelése révén gátolja, melynek következtében csökken az NF- $\kappa$ B transzkripció aktivitása. Ugyanakkor a későbbi kutatások azt mutatták, hogy bár az adenzin gyulladáscsökkentő hatása az LPS-mediált citokin termelés cAMP közvetített folyamat, de független a protein kináz A-tól és az Epac-tól, valamint nem befolyásolja az NF- $\kappa$ B aktivitást sem.

Összhangban ezekkel az eredményekkel azt találtuk, hogy az  $A_{2A}$  jelátvitel nem befolyásolta az LPS/TLR4 komplexről induló NF- $\kappa$ B aktivációt. Ezzel szemben bemutattuk, hogy az  $A_{2A}$  jelátvitel út folyamatosan működik a makrofágokban és kordában tartja a MAP kinázok aktivitását. Ezek alapján az  $A_{2A}$  receptor hiányos, nem stimulált makrofágokban a p38 $\alpha$ , ERK2 és JNK MAP kinázok nagyobb mértékű alap foszforilációját detektáltuk a vad típusú makrofágokhoz képest. LPS hatására a makrofágokban megnő az  $A_{2A}$  receptor kifejeződése és az adenzin jelátviteli mechanizmusa gátolja az LPS-indukált MAPK aktivációt. Ennek eredményeként csökken a JNK foszforilációja és gátlódik az LPS-indukált JNK-függő gyulladási citokineknek, pl. MIP-2, IL-6 és TNF- $\alpha$ ,a kifejeződése.

Az a tény, hogy mindhárom MAPK fokozott foszforilációját megfigyeltük, két okból lehetséges: vagy az MAP kinázok aktivációja volt kifejezettebb vagy az őket „kikapcsoló” kettős specificitású foszfatázoknak az expressziója csökkent. Kimutattuk, hogy a JNK1 aktivációban szerepet játszó MAP2 kinázok LPS hatására bekövetkező foszforilációját az  $A_{2A}$ R jelátviteli út nem befolyásolta, viszont az adenilát-cikláz útvonalon keresztül fokozta a MAP kinázok egyik negatív szabályozó molekulájának, a DUSP1 kettős specificitású foszfatáznak a kifejeződését. Ennek következtében az  $A_{2A}$  receptor hiányos makrofágokban a DUSP1 mRNS és fehérje mennyisége alap állapotban és LPS



kezelést követően is csökkent szintet mutatott, ami felelős lehet a receptor hiányos makrofágok fokozott JNK1 foszforilációjáért. Megfigyeltük továbbá, hogy DUSP1 hiányában felfüggesztődik az  $A_{2A}R$  jelátvitel gyulladáscsökkentő hatása, ami arra utal, hogy az  $A_{2A}R$  és a DUSP1 közösen, 1 jelátviteli úton működve vesz részt a makrofágok gyulladási válaszában a szabályozásában.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

A programozott sejthalál vagy apoptózis folyamata nagy jelentőséggel bír a többsejtű élőlények megfelelő egyedfejlődésében és homeosztázisának fenntartásában, valamint kulcsszerepet tölt be az immunsejtek tímuszban lezajló differenciálódásában és az autoreaktív sejtek eltávolításában. A tímuszban folyamatosan keletkező apoptotikus sejtek gyors és alapos eltávolítása a környező makrofágok által történik (efferocitózis), ami általában gyulladás nélkül megy végbe. Ez részben annak köszönhető, hogy az elhaló sejteket fagocitáló makrofágok gyulladáscsökkentő mediátorokat termelnek. Emellett masszív apoptózis figyelhető meg gyulladásos környezetben is, ahol a neutrofilek feladatuk végeztével apoptózissal halnak el. Ebben az esetben a makrofágok által kibocsátott szignálok a gyulladás mielőbbi megfékezését szolgálják. Laborunkban folyó korábbi kutatások két ilyen efferocitózis-függően felszabaduló mediátort azonosítottak: az adenozin és a retinsavakat. Disszertációmban azt vizsgáltam, hogy ezek a szignálok hogyan járulnak hozzá a jól működő és hatékony apopto-fagocitózis rendszer kialakításához.

Összegezve elmondható, hogy a tímuszban a makrofágok által apoptotikus sejtfelevétel hatására termelődő retinoidok és adenzin együttesen hozzájárulnak az éretlen timociták neglekciónal történő elhalásához. Továbbá a retinoidok elősegítik az apoptotikus sejtek fagocitózisának folyamatát, míg az adenzin csökkenti a fagocitáló makrofágokban az apoptotikus sejtfelevétel által indukált kemoattraktánsok felszabadulását. Eredményeim a retinoidok által kiváltott timocita sejthalál részletes mechanizmusát írják le. Úgy véljük, hogy a retinoidok a mitokondriális útvonalat aktiválva egy Nur77-függő apoptotikus folyamatot indítanak el, hozzájárulva az éretlen timociták neglekciónal történő hatékony eltávolításához és ezáltal a megfelelően működő T-sejt populáció kialakulásához.

Gyulladásos körülmények között a retinsavak azon túl, hogy elősegítik az apoptotikus sejtek efferocitózisát, hozzájárulnak a regulatorikus T-sejtek kialakulásához. Az adenzin másrészt gátolja az LPS-kiváltotta gyulladáskeltő mediátorok képződését a makrofágokban, védelmet nyújtva a túlzott, kontrollálatlan immunválasz kialakulásával szemben. Adataim azt mutatják, hogy az adenzin makrofágokra gyakorolt ezen hatásai az  $A_{2A}$  receptorokon keresztül valósulnak meg. A receptor aktiválása fokozza az LPS jelátvitel egyik negatív szabályozó fehérjéjének, a DUSP1 foszfatáznak a kifejeződését. Attól függően, hogy az efferocitózis milyen biológiai környezetben megy végbe, az apoptotikus sejtet fagocitáló makrofágok által termelt szolubilis biomolekulák számos különböző biológiai folyamat irányításában vehetnek részt és eredményeim hozzájárulnak szerepük és hatásmechanizmusuk tisztább megértéséhez.

## 7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/295/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

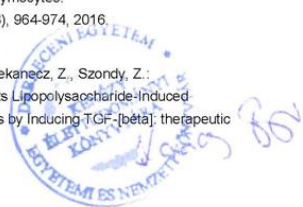
Jelölt: Kiss Beáta  
Neptun kód: E0C2ZZ  
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Koröskényi, K., **Kiss, B.**, Szondy, Z.: Adenosine A2A receptor signaling attenuates LPS-induced pro-inflammatory cytokine formation of mouse macrophages by inducing the expression of DUSP1.  
*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1863 (7), 1461-1471, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.04.003>  
IF: 5.128 (2015)
2. **Kiss, B.**, Tóth, K. Á., Sarang, Z., Garabuczi, É., Szondy, Z.: Retinoids induce Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes.  
*Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1853 (3), 660-670, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.035>  
IF: 5.128

### További közlemények

3. Sándor, K., Dániel, B., **Kiss, B.**, Kovács, F., Szondy, Z.: Transcriptional control of transglutaminase 2 expression in mouse apoptotic thymocytes.  
*Biochim. Biophys. Acta. Gene Reg. Mechan.* 1859 (8), 964-974, 2016.  
IF: 5.373 (2015)
4. Pallai, A., **Kiss, B.**, Vereb, G., Armaka, M., Kollias, G., Szekanecz, Z., Szondy, Z.: Transmembrane TNF-[alfa] Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF-[beta]2: therapeutic Implications.  
*J. Immunol.* 196 (3), 1146-1157, 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1501573>  
IF: 4.985 (2015)





**DEBRECENI EGYETEM**  
**EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**



5. Sarang, Z., Garabuczi, É., Joós, G., **Kiss, B.**, Tóth, K. Á., Rühl, R., Szondy, Z.: Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes.  
*Immunobiology*. 218 (11), 1354-1360, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.009>  
IF: 3.18
6. Garabuczi, É., **Kiss, B.**, Felszeghy, S. B., Tsay, G. J., Fésüs, L., Szondy, Z.: Retinoids produced by macrophages engulfing apoptotic cells contribute to the appearance of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes.  
*Amino Acids*. 44 (1), 235-244, 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-011-1119-4>  
IF: 3.653
7. Szondy, Z., Garabuczi, É., Tóth, K. Á., **Kiss, B.**, Koröskényi, K.: Thymocyte death by neglect: contribution of engulfing macrophages.  
*Eur. J. Immunol.* 42 (7), 1662-1667, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201142338>  
IF: 4.97

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 32,417**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,256**

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

Debrecen, 2016.11.07.



## AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK

### ANGOL NYELVŰ ELŐADÁSOK:

Beáta Kiss, **Retinoids induce a Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes**. 8th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015, Január 8-10.

Beáta Kiss: **The role of Nur77 in retinoid-induced apoptosis of mouse thymocytes**. Collaboration with Prof. Gregory J. Tsay, Chung Shan Medical University, Taiwan, Taichung, 2013, Április 1.

Beáta Kiss: **Retinoid-induced apoptosis in mouse thymocytes**. 6<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2013, Január 8-11.

Beáta Kiss: **Retinoids induce a Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes**. 5<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2011, Január 4-7.

Beáta Kiss: **Regulation of retinoid induced apoptosis of thymocytes**. 4<sup>th</sup> Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2011, Január 11-14.

### POSZTEREK:

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Éva Garabuczi, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Retinoids induce a Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes**. 3rd Defense-net (Véd-Elem) Scientific meeting, Debrecen, 2014, Június 13.

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Éva Garabuczi, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Retinoids induce a Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes**. 21<sup>st</sup> ECDO Euroconference on Apoptosis, Franciaország, Párizs, 2013, Szeptember 25-28.

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, Éva Garabuczi, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Retinoids induce a Nur77-dependent apoptosis in mouse thymocytes**. FEBS 3+ Meeting, Horvátország, Opatija, 2012, Június 13-16.

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Regulation of retinoid induced apoptosis of thymocytes**. 18<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis, Belgium, Gent, 2010, 1-4 Szeptember 1-4.

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Regulation of retinoid induced apoptosis of thymocytes** (in English) Annual Meeting of Hungarian Biochemical Society, 23-26 August 2010, Budapest, Hungary.

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Retinoids induce apoptosis in mouse thymocytes via inducing Nur77 expression**. MAC09' EMBO Workshop on Mitochondria, Apoptosis, Cancer, Csehország, Prága, 2009, 1-3 Október 1-3.

Beáta Kiss, Katalin Tóth, Zsolt Sarang, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Retinoids induce apoptosis in mouse thymocytes via inducing Nur77 expression**. 15<sup>th</sup> International Summer School on Immunology, 2009, Horvátország, Hvar, Szeptember 5-12.