

**A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ  
KIFEJEZŐDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA EGÉR  
APOPTÓTIKUS TIMOCITÁKBAN**

**DÁNIELNÉ SÁNDOR KATALIN**

*TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA*



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2016

# **A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ KIFEJEZŐDÉSÉNEK SZABÁLYOZÁSA EGÉR APOPTÓTIKUS TIMOCITÁKBAN**

**DÁNIELNÉ SÁNDOR KATALIN**

OKLEVELES MOLEKULÁRIS BIOLÓGUS/BIOKÉMIKUS-GENOMIKUS

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

DEBRECENI EGYETEM  
FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

- A Doktori Szigorlati Bizottság Elnöke: PROF. DR. MATESZ KLÁRA, AZ MTA DOKTORA
- A Doktori Szigorlati Bizottság Tagjai: PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA  
IFJ. PROF. DR. GALLYAS FERENC, AZ MTA DOKTORA
- A Doktori Szigorlat Időpontja, Helye: 2016. december 12. 10:30  
Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati Tanszék, Dékáni Tárgyaló
- Az Értekezés Bírálói: PROF. DR. BOROS IMRE, AZ MTA DOKTORA  
DR. BAY PÉTER, AZ MTA DOKTORA
- A Bírálóbizottság Elnöke: PROF. DR. MATESZ KLÁRA, AZ MTA DOKTORA
- A Bírálóbizottság Tagjai: PROF. DR. BOROS IMRE, AZ MTA DOKTORA  
DR. BAY PÉTER, AZ MTA DOKTORA  
PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA  
IFJ. PROF. DR. GALLYAS FERENC, AZ MTA DOKTORA
- Az Értekezés Védésének Időpontja: 2016. december 12. 12:30
- Az Értekezés Védésének Helye: DE ÁOk Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

## 1. BEVEZETÉS

### Az apoptózis

Az apoptózis kifejezést Kerr, Wyllie és Currie vezette be, 1972-ben. Mikroszkopikus strukturális változásokat azonosítottak a sejtekben, mint a sejt zsugorodás, nukleáris fragmentáció, kromatin kondenzáció és kromoszómális DNS fragmentáció. Továbbá azt is megfigyelték, hogy az apoptótikus sejtek plazmamembránja radikálisan különbözik az élő sejtektől.

### Az apoptózis mechanizmusa

Az apoptózis egy meglehetősen komplex folyamat. A legutóbbi két évtized kutatásai két fő apoptótikus útvonalat azonosítottak: az extrinzik – vagy halál receptor útvonalat –, és az intrinzik – mitokondriális –, útvonalat. Később kimutatták, hogy ez a két útvonal kommunikál egymással. Továbbá egy teljesen független útvonalat is azonosítottak, ami a T sejtek által közvetített citotoxikus folyamatokat indítja el perforin-, granzim függő útvonalakon keresztül. Ez a három apoptótikus útvonal végül a végrehajtó kaszpáz 3-at aktiválja, ami DNS fragmentációhoz, citoskeletális és nukleáris fehérjék degradációjához, fehérjék keresztkötéséhez, apoptótikus sejtek kialakulásához, fagocita sejt receptor ligandok expressziójához és végül a klasszikus fagocitózishoz vezet.

### Apoptózis a tímuszban

A tímusz egy elsődleges limfoid szerv, mely több lebenyből épül fel. Az immunkompetens T limfociták kialakulásáért felelős  $CD4^+CD8^+$  sejtek dupla negatív csontvelői progenitorokból alakulnak ki. A tímuszban található molekulák milióje irányítja ezt a folyamatot, amelyet különböző sejtek, pl. dendritikus sejtek, makrofágok, endoteliális sejtek, fibroblasztok és tímusz eredetű epitheliális sejtek szekretálnak. A  $CD4^+CD8^+$  dupla pozitív timociták 90%-a elhal a negatív és pozitív szelekció során. Amennyiben ez a bonyolult folyamat zavart szenved, autoimmun betegség alakulhat ki.

### Apoptótikus sejtek eltakarítása

*In vivo*, az apoptótikus program fagocitózissal fejeződik be. A makrofágok kulcsfontosságú szereppel bírnak ebben a folyamatban. Az apoptózis korai stádiumában az apoptótikusan elkötelezett sejtek „tárlj meg” szignálokat bocsátanak ki, ilyenek lehetnek a nukleotid trifoszfátok (ATP/UTP),

lizofoszfátidil kolin, CX3CL1 kemokinek, amelyek elindíthatják a professzionális fagociták migrációját. Ezután az ún. „egyél meg” jeleket teszik elérhetővé a sejtfelszínükön. Az egyik legfontosabb egyél meg szignál a foszfátidil szerin (PS) mely fagocita receptorok által felismerhető (Bai1, Tim-4, Stabili-2). Illetve más hídképző molekulák is részt vehetnek a folyamatban, pl. Milk Fat Globule-EGF Factor 8 (MFG-E8). Végül a fagocitált sejtrészecskék a fagolizozómális útvonalon keresztül emésződnek meg.

A professzionális fagociták általi apoptotikus sejt eltakarítás evolúciósan konzervált folyamat, amely megakadályozza a citotoxikus immunogén sejtalkotók kiszabadulását. A megfelelő eltakarítás hiányában az elhaló sejtek másodlagos nekrozison mennek keresztül, ami gyulladáshoz vezet és jelenlegi tudásunk szerint akár autoimmunitáshoz is. A legfontosabb különbség az apoptotikus sejtet vagy baktériumot felvevő fagocita válasz között, hogy az apoptotikus sejt felvételt gyulladáscsökkentő citokinek szekréciója követi, pl. IL-10, TGF $\beta$ , vérlemezke aktiváló faktor, prosztaglandin E2, adenzin. Ezzel egy időben a proinflammatorikus citokinek produkciója gátlódik, így megakadályozva a gyulladást és autoimmun válaszokat. Fontos megemlíteni, hogy az apoptotikus sejtek eltakarításának defektusai autoimmun betegségekhez vezetnek, pl. szisztémás lupus erythematosus (SLE), reumatoid artritisz.

### **A makrofágok által szekretált molekulák apoptózist váltanak ki a tímuszban**

Több csoport, beleértve a miénket is, igazolta, hogy a fagocitózis során kibocsátott molekulák gátolják a gyulladáskeltő citokinek termelését (TGF $\beta$ , adenzin, retinoidok). Ezek az anyagok autokrin módon a makrofágokon is hatnak, de a dupla pozitív timociták is kifejezik az ezeket felismerő receptorokat. Ezek a mediátorok kritikus szerepet töltenek be a proapoptotikus tímusz környezet kialakulásában, amely eltakarítja az autoreaktív timocitákat.

### **TGF $\beta$**

A transzformáló növekedési faktor béta jelátvitel kritikus szerepet játszik a sejtek növekedésében, differenciálódásában és más biológiai folyamatokban. A jelátviteli útvonal a szerin/treonin receptor kinázok oligomerizálódásával kezdődik, amely a citoplazmatikus SMAD jelátvivő faktorok foszforilálódásához vezet. Érdekes módon az apoptotikus sejtek felismerése TGF $\beta$  szekrécióhoz vezet a makrofágokból. Ugyanakkor, a fagociták TGM2-t is termelnek, ami aktiválja a TGF $\beta$ -t. Az elhaló timocitákban a TGF $\beta$  indukálja a TGM2 kifejeződését és fokozza az apoptózist, míg a makrofágok fagocita kapacitását megnöveli és csökkenti a gyulladáshoz vezető citokinek kibocsátását.

## **Adenozin**

Az adenozin egy purin nukleozid, amely a sejtekből felszabadulva, vagy extracellulárisan keletkezve eljut a környező sejtek receptoraihoz. Négy adenozin receptor létezik, amelyek mindegyike G fehérje-kapcsolt receptor: A1, A2A, A2B, A3.

Hasonlóan más Gs fehérje-kapcsolt receptorhoz, az A2A receptorok adenilát cikláz mediált útvonalakon keresztül kommunikálnak a downstream jelátviteli egységekkel. Az enzim aktiváció másodlagos hírvívó molekula cAMP növekedéshez vezet, amely a protein kináz A enzimet aktiválja. A PKA ezután a CREB-et foszforilálja, ami ennek következtében a cAMP válaszadó elemekhez kötődik a genomban és gének expresszióját változtatja meg. Az A2AR aktiváció képes a MAPK jelátviteli útvonalon keresztül is kommunikálni a sejttaggal, ezáltal egy alternatívát szolgáltatva. Az A2AR magasan expresszálódik azokon az immunsejteken, amelyek az immunválasz szabályozásában vesznek részt, pl. makrofágok, dendritikus sejtek, híví sejtek, neutrofilek, endotheliális sejtek, ami előre vetíti a széleskörű immunregulatórikus funkcióját.

## **Retinoidok**

Az ATRA (all-transz retinsav) és 9-cis retinsav fiziológiás ligandjai a retinsav -, és retinoid X receptoroknak (RXR). Ezek a transzkripciós faktorok a magreceptorok szupercsaládjába tartoznak és ligand függő direkt módon DNS-hez kötődő transzkripciós regulátorokként váltak ismertté. Az RXR egy általános heterodimerizáló partnere több magreceptor, pl. retinsav receptor (RAR). Az RXR heterodimerizációs kapacitása szükséges a partnerek megfelelő kötéséhez és a génexpresszió szabályozásához. Az RXR heterodimerek aktiválhatók az egyik (nem permisszív: RXR-RAR), vagy mindkét oldalról (permisszív RXR-liver X receptor).

## **Transzglutamináz 2 (TGM2) egy multifunkcionális enzim, élet és halál eldöntője**

A TGM2 egy egyedi és széles körben expresszálódó tagja a transzglutamináz enzim családnak, emiatt szöveti transzglutamináz néven is ismert. Az elsődleges enzimatis aktivitásán túl (a polipeptid láncok Ca<sup>2+</sup> függő transzamidálása), G-fehérje, protein diszulfid izomeráz, protein kináz és DNS nukleáz funkcióval is rendelkezik. A TGM2 számos biológiai folyamatban vesz részt, többek között az apoptózisban is szerepet játszik. A fő apoptotikus funkciója a keresztkötő aktivitásán keresztül valósul meg. Az enzim aktiválódása erősen keresztkötött protein polimerek megjelenéséhez vezet az

apoptótikus sejtkompartmentekben. Ezek a fehérje aggregátumok fontos szerepet játszanak a káros intracelluláris komponensek visszatartásában.

Érdekes módon a TGM2 nem csak segíteni tudja az apoptózis folyamatát, hanem gátolni is. A timocita apoptózis során inkább pro-apoptótikus aktivitással rendelkezik.

### **A makrofágok által termelt molekulák szabályozzák a TGM2 expresszióját az elhaló timocitákban**

A TGM2-ről régóta tudjuk, hogy szerepet játszik az *in vivo* timocita apoptózisban. Amíg a TGM2 erősen indukálódik az *in vivo* program során, ugyanannak a stimulusnak a jelenlétében *in vitro* nem tapasztaltunk indukciót, amely arra utal, hogy az *in vivo* szöveti környezetben lévő más szignáloknak kell indukálnia a TGM2 kifejeződését. Később laborunk megmutatta, hogy az apoptótikus timocitákat fagocitáló makrofágok által termelt molekulák – retinoidok, TGF $\beta$ , adenzin – indukálják a TGM2 kifejeződését.

### **A Tgm2 promóter centrikus térképezése**

A Tgm2 főként transzkripcionális szinten szabályozódik, illetve bemutatták, hogy a humán Tgm2 promóter számos jelátviteli molekulára válaszol. A retinoidok az egyik legjobban ismert aktivátorai a humán Tgm2 promóternek. A retinoid válaszadó elemeket -1,7 kb-re azonosították a transzkripciós starthelyhez (TSS) viszonyítva. A promóter tartalmaz még TGF $\beta$  válaszadó elemet, amely -0,9 kb-re helyezkedik el a gén TSS-éhez viszonyítva.

### **Az intergenikus enhanszer elemek helyének és jellemzőinek térképezése**

A többsejtű szervezetekben a cisz-regulátor elemek szétszórtan helyezkednek el a genomban, sokszor egészen távol a célgénjeiktől.

Az enhanszerek kritikus regulátorai a génexpresszióknak, amelyek mutációja örökletes betegségeket okozhat. Ezek a DNS szekvenciák képesek transzkripciós faktorokat és preiniciációs komplex tagokat rekrutálni és kapcsolatba lépni a célgénjeikkel az ún. kromatin hurokképzési mechanizmusokon keresztül. Az enhanszereken kötődő transzkripciós faktor komplexek képesek ATP függő kromatin remodelláló komplexeket rekrutálni, ezáltal újrainni a kromatin szerkezetet és facilitálni a transzkripciós iniciációt és elongációt. ChIP-seq kísérletek segítségével több enhanszer markert azonosítottak napjainkban, amelyek segítségével a genom szintű enhanszer térképezés megvalósulhatott. Bizonyos hiszton acetiltransferázok (CBP/P300) és hiszton módosítások (H3K27ac, H3K4me1, H3K4me2)

kötési profilja alapján azonosíthatók a sejtspecifikus enhanszer elemek. Továbbá, a nemrég azonosított enhanszer eredetű transzkriptek (eRNS) egy újabb, és talán a legjobb aktív enhanszer markerként híressé váltak. Ezeknek a markereknek a kombinációja egy egyedi lehetőséget biztosít arra, hogy egy bizonyos sejttípusban feltárjuk egy gén lehetséges aktív enhanszer készletét.

A legújabb szekvenáló technológiákat felhasználva, az ENCODE konzorcium több száz genom szintű adat szettet publikált, 30 cikk formájában, 2012-ben. A konzorcium célja a humán és egér cisz-regulátor elem hálózatának azonosítása volt. A hatalmas mennyiségű teljes genom szintű adat óriási lehetőségeket biztosít arra, hogy azonosítsuk a vizsgált gének lehetséges enhanszer készletét.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy a TGM2 *in vivo* indukálódik, de *in vitro* nem, mely arra utal, hogy a szöveti környezetben jelenlévő más szignálok is hozzájárulnak a TGM2 indukciójához. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok által termelt retinoidok és a TGF- $\beta$  részt vesznek ebben a folyamatban. Mivel az adenoizint ugyancsak termelik a makrofágok, úgy döntöttünk, hogy

- vizsgálni fogjuk az **adenoizin lehetséges szerepét** a TGM2 kifejeződésében, apoptotikus timocitákban.
- meghatározzuk a elhaló timociták eltakarítása során keletező **adenoizin eredetét**

A TGM2 fehérje *in vivo* megjelenése az elhaló timocitákban úgy tűnik transzkripciós szinten szabályozódik. Az irodalomban már korábban ismert volt, hogy a TGM2 promótere tartalmaz TGF $\beta$  és retinoid válaszadó elemet. Az eddigi tanulmányok viszont csak a gén promóterére korlátozódtak. Ezért úgy döntöttünk,

- azonosítjuk a szöveti traszglutamináz **cisz-regulátor elemeit** a timocita apoptózis során
- és karakterizáljuk őket,
  - **eRNS** produkció mérésével,
  - **transzkripciós faktorok kötését** (RXR, RAR, CREB, SMAD4),
  - **koaktivátorok** (P300, CBP) és H3K27ac **hiszton marker** feldúsulását vizsgálva.



### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### Kísérleti állatok

Kísérleteink során 4 hetes és vad típusú C57BL/6 egereket használtunk. Néhány kísérletben A2A receptor hiányos egeret használtunk. Minden kísérlet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével történt.

#### *in vivo* timocita apoptózis kiváltása

4 hetes egereket intraperitoneálisan oltottunk 0,3 mg DEX-al - DMSO/fiziológiás sóoldatban beoldva -, így indukálva az apoptotikus timociták keletkezését a tímuszban. A kontroll egerek a kezelt egerekkel megegyező dózisban kaptak DMSO/fiziológiás sóoldat keveréket. Az oltás után tímuszt eltávolítottuk az egerekből a kísérletekben megjelölt kezelési időket követően. A tímusz eltávolítását követően mértük a kontroll és a kezelt egerekben a tímusz súlyát, ebből következtetve az elhalt sejtek mennyiségére a kezelt egerekben a kontroll egerekben mért tímusz súlyhoz képest.

#### Timocita kultúra

Az izolált timocitákat ( $1 \times 10^7$ /ml) 10 %-os aktív szénnel kezelt FBS -t tartalmazó RPMI 1640 médiumban kezeltük, a médiumot kiegészítve 2 mM glutaminnal, 1 mM Na-piruváttal, 100 U/ml penicillinnel és 100 mg/ml sztreptomocinnal, majd 37°C-on 5%-os CO<sub>2</sub> tartalom mellett inkubáltuk. A kísérletben a timocitákat 5  $\mu$ M NECA (5'-N-ethylcarboxamidoadenozin)-val, az adenozin egy nem metabolizálódó analógiával, 1  $\mu$ M CGS21680, A2AR agonistával (Tocris Bioscience, Eching, Germany), 1  $\mu$ M forskolinral, az adenilát cikláz aktivátorával, 100  $\mu$ M Rp-cAMP-S trietilaminnal, az endogén cAMP kompetitív analógiával, vagy 100  $\mu$ M db-cAMP, egy sejt permeabilis cAMP analóggal, 1  $\mu$ M AM580, RAR agonistával, 100 nM LG268, RXR agonistával kezeltük önmagában, vagy kombinációban 5 ng/ml rekombináns humán TGF- $\beta$ 1-el (AbD Serotec, Kidlington, UK) illetve 0.3  $\mu$ M 9-cis retinsavval (9cRA) (Tocris Bioscience, Eching, Germany) a bemutatott időpontokban.

#### Makrofágok izolálása és tenyésztése

A makrofágokat steril fiziológiás sóoldattal történő hasüregi mosással nyertük, majd 2 napon keresztül RPMI médiumban (10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, 1 mM Na-piruvát, 50  $\mu$ M 2-merkaptoetanol) termosztátban (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) te-nyésztettük. 3-4 órás inkubálást követően az úszó sejteket lemostuk, majd a médiumot naponta cseréltük.

## Citokintermelés meghatározása

Vad típusú makrofágokat apoptotikus sejtekkel inkubáltunk 1 órán át, ecto-5'-nucleotidase inhibitor methylene adenosine-5'-diphosphate (50  $\mu\text{M}$ ) és NECA (5  $\mu\text{M}$ ) jelenlétében vagy hiányában. Az apoptotikus sejteket 1 óra fagocitózis után lemostuk, a makrofágokat pedig további 5 órán keresztül inkubáltuk friss médiumban a vegyületek visszapótlása mellett. Az inkubációs idő letelte után a sejt-felülúszókat összegyűjtöttük, majd egér citokin array (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Kit, R&D Systems) vagy ELISA kitek (Quantikine ELISA Kitek, R&D Systems) felhasználásával analizáltuk a gyártó által mellékelt protokollok szerint.

## RT-QPCR

A kontroll és kezelt tímuszokból, valamint az *in vitro* kezelt timocitákból az RNS-t TRI reagens segítségével izoláltuk, a gyártó által megadott protokollt használva. Az izolálás befejezését követően az RNS-t 20  $\mu\text{l}$  Rnáz-mentes vízben oldottuk fel. Az RNS minták koncentrációját és tisztaságát Nanodrop Spektrofotométer (Thermo) segítségével mértük. eRNS mérés esetén DNáz emésztést alkalmaztunk (1 órán át 37 °C-on, majd 10 perc 75°C-on inaktívtuk az enzimet). Minden mintát azonos koncentrációjúra hígítottunk a reverz transzkripció PCR megkezdése előtt. Kísérleteink során „High Capacity cDNA Reverz Transcription Kit” (ABI) felhasználásával, a gyártó által megadott protokoll alapján végeztük az RNS cDNS-é való átírását.

Minden reakció 5  $\mu\text{l}$  cDNS mintát tartalmazott. A minták TG2 és ciklofillin mRNS tartalmát 3 technikai párhuzamos alkalmazásával határoztuk meg a mérés során. Az eredmények kiértékelését ABI PRISM SDS2.1 szoftver használatával, összehasonlító CT módszerrel végeztük.

## Primer tervezés

A transzkripció faktor kötőhelyhez viszonyítva a kódoló és a nem-kódoló szárlól enhanszer RNS-ek keleteznek, amelyekre specifikus primer párok tervezhetők és QPCR reakciók segítségével meghatározható a keletkezett eRNS mennyisége, és ezen keresztül egy adott enhanszer aktivitása. Primer3 software segítségével eRNS specifikus primereket terveztünk alapértelmezett kondíciókat alkalmazva, kivéve a következőket: ampikon hosszúság: 90-150bp; Tm: 59-60°

## Western blot

Az izolált tímuszokokat homogenizáltuk jéghideg 0,5%-os Triton X-et tartalmazó lízis pufferben. Az egyes minták fehérje koncentrációját 2 mg/ml-re hígítottuk, majd egyenlő térfogatú Laemmli puffert adtunk hozzá és a mintákat 100°C-on 10 percig forraltuk. A fehérjék elválasztását 10%-os SDS-

poliakrilamid géllal végeztük a TG2 esetében, detektálásuk pedig PVDF membránon történt anti-TG2 és anti- $\beta$ -actin antitestek felhasználásával.

### **ATP meghatározása**

4 hetes vad típusú vagy pannexin-1 hiányos egerekből izolált timocitákat 24 órán át inkubáltuk ( $10^7$  cells/ml) szérum mentes RPMI 1640 médiumban. A sejtek felülúszóját ezután begyűjtöttük, az ATP meghatározása ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System (PerkinElmer) kit segítségével történt, a gyártó által megadott protokoll szerint.

### **Kromatin immunprecipitáció**

A sejteket először keresztkötöttük Di(N-succinimidyl) glutarátal (ProteoChem, USA), 30 percig inkubáltuk, majd keresztkötöttük formaldehiddel, 10 percig. A reakciót glicin hozzáadásával állítottuk le. A kromatint Diagenode Bioruptor segítségével szonikáltuk, 200-1000 bp fragmenteket generálva. Az immunprecipitációt a következő antitestekkel végeztük: IgG (Millipore, 12-370), RXR (sc-774), P300 (sc-585), CBP (sc-369X), CREB1 (ab31387), SMAD4 (sc-7154X), H3K27ac (ab4729) Merck (Budapest, Hungary), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA) vagy Abcam (Cambridge, UK) cégektől. A kromatin-antitest komplexeket Protein-A-val fedett paramágneses gyöngyök (Life technologies, USA) segítségével precipitáltuk. 6 mosási lépést követően a komplexeket eluáltuk majd a keresztkötést felbontottuk. A DNS fragmenteket oszlopon tisztítottuk (Qiagen, MinElute), hígítottuk, majd qPCR analízisnek vetettük alá.

### **Kromoszóma konformációs vizsgálat (3C)**

A timociták izolálása után 2% formaldehiddel végeztük a keresztkötést 10 percig. A reakció glicin hozzáadásával lett leállítva, majd sejtmagot izoláltunk. A kromatint HindIII restriktációs enzimmal vágtuk, és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk. A következő nap a kromatin ligálását T4 DNS ligáz (50U) jelenlétében végeztük 16 °C-on, 16 órán át. A ligált DNS fragmenteket fenol:kloroform extrakcióval izoláltuk. A PCR reakciót kb 100 ng templáttal végeztük.

### **Statisztikai analízis**

A bemutatott eredmények legalább három független kísérlet adatait mutatják be, melyeknél a szignifikanciát kétszélű, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbával adtuk meg ( $p < 0.05$ ).

## 4. EREDMÉNYEK

### AZ ADENOZIN A2A RECEPTOR AKTIVÁCIÓJA HOZZÁJÁRUL A TG2 KIFEJEZŐDÉSÉHEZ A TIMOCITA APOPTÓZIS SORÁN *IN VITRO*

Laborunkban előzőleg kimutattuk, hogy a makrofág eredetű TGF- $\beta$  és retinoidok részt vesznek a TG2 kifejeződésében az elhaló timocitákban, ezért úgy döntöttünk, tesztelni fogjuk vajon az adenzin – amely ugyancsak termelődik az apoptotikus sejtek fagocitózisa során – szerepét a Tgm2 indukcióban a timocitákban. Mivel az adenzin gyorsan metabolizálódik a timociták adenzin deamináz enzime által, egy nem metabolizálódó analógját, a NECA-t használtuk, melyről ismert, hogy hatással van az adenzin receptorok mindegyik altípusára. A Tgm2 mRNS mérése során a timocitákat NECA-val kezeltük 6 órán át, mivel korábbi adatok arra utalnak, hogy ebben az időpontban tetőzik a Tgm2 expressziója a timocitákban. A NECA-val való kezelés a vad típusú timocitákban kétszeres növekedést okozott a Tgm2 indukcióban, amely arra utalt, hogy az adenzinnak szerepe lehet a gén szabályozásában.

A timociták expresszálják az adenzin receptorok A2A és A3 típusát. Hogy eldöntsük, melyik adenzin receptor felelős az adenzin mediált Tgm2 expresszióban, A2A és A3 receptor hiányos egerekből izolált timocitákat is NECA-kezeltünk. Amíg a NECA az A2AR hiányos timociták Tgm2 expresszióját szignifikánsan csökkentette, nem volt hatással az A3R hiányos timociták Tgm2 expressziójára. Adataink tehát arra utalnak, hogy az adenzin az A2A receptoron keresztül fejti ki hatását a Tgm2 gén expressziójára.

A következő lépésben a szelektív A2AR aktiváció hatását vizsgáltuk a Tgm2 kifejeződésben. A CGS21680, specifikus agonistát önmagában vagy TGF- $\beta$ -val és retinoidokkal együtt alkalmaztuk. Laborunkban Garabuczi Éva korábban már megmutatta, hogy a Tgm2 mRNS expressziójára a 9-*cis* retinsav (9cRA) volt a legerősebben ható retinoid, ezért a továbbiakban ezt használtuk.

Eredményeink azt mutatják, ahogy a TGF $\beta$ , 9cRA vagy CGS21680 önmagukban mind növelik a Tgm2 szintjét a timocitákban *in vitro*, ezek közül pedig a 9cRA volt a leghatékonyabb induktor.

Az A2AR aktivációja nem növelte a TGF- $\beta$  -, de szignifikánsan emelte a 9cRA - indukált Tgm2 expressziót. Ahogy Garabuczi Éva korábban kimutatta, a TGF- $\beta$  növelte a 9cRA-indukált Tgm2 expressziót. Mindazonáltal a legszignifikánsabb (20 x) indukciót akkor tapasztaltuk, amikor a

három vegyületet együtt alkalmaztuk. Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy a retinoidok, az adenosin és a TGF- $\beta$  – melyek mindegyike termelődik a fagocitáló makrofágok által – együtt szignifikánsan növelik a Tgm2 kifejeződését elhaló timocitákban.

### **AZ ADENOZIN A2A RECEPTOR AZ ADENILÁT CIKLÁZ ÚTVONALON KERESZTÜL SZABÁLYOZZA A TGM2 GÉN KIFEJEZŐDÉSÉT A TIMOCITÁKBAN**

Irodalomból ismert, hogy az A2A receptor az adenilát cikláz és foszfolipáz C útvonalhoz is kapcsolt más sejtekben. Laborunk korábbi eredményei alapján egér timocitákban viszont csak az adenilát cikláz útvonalat aktiválják. Hogy teszteljük, vajon az adenilát cikláz útvonal hozzájárul-e a Tgm2 gén kifejeződéséhez, a cAMP specifikus membrán permeábilis kompetitor analógját (Rp-cAMP trietilamin) alkalmaztuk. Rp-cAMP trietilamin jelenlétében, az A2A receptort aktiváló CGS21680 sem önmagában, sem kombinációban nem volt képes emelni a Tgm2 mRNS szintjét.

Következő lépésben arra voltunk kíváncsiak, hogy az adenilát cikláz útvonal önmagában szerepet játszik-e a Tgm2 kifejeződésében a timocitákban. Eredményeink azt mutatják, hogy az adenilát cikláz aktiváló forskolin, illetve a dibutilil-cAMP (dbcAMP), egy membrán permeábilis cAMP analóg mind önmagában, mind kombinációban 9cRA-val vagy 9cRA-val és TGF- $\beta$ -val, a Tgm2 mRNS szintjének növekedését eredményezte. Összességében tehát a cAMP szintet növelő vegyületek hozzájárulnak a Tgm2 gén kifejeződéséhez, az adenilát cikláz útvonalon keresztül.

### **AZ ADENOZIN A2AR AKTIVÁCIÓ *IN VIVO* IS HOZZÁJÁRUL A TGM2 GÉN EXPRESSZIÓJÁHOZ AZ ELHALÓ TIMOCITÁKBAN**

Kíváncsiak voltunk továbbá, hogy az adenosin a timociták *in vivo* apopto-fagocitózisa során is szerepet játszik-e a szöveti transzzglutamináz felregulálásában.

Azt találtuk, hogy a dexametazonnal – amely egy hatékony apoptózis induktora a timocitának – intraperitoneálisan oltott A2AR hiányos egerek tímuszában szignifikánsan csökkent a transzzglutamináz 2 kifejeződése a vad típushoz képest, mind mRNS, mind fehérje szinten, mely nem a timikus apoptózis indukciójának zavarához köthető, mivel nem találtunk különbséget a két egértörzs tímuszának súlyvesztésében. Ez párhuzamban van előző eredményeinkkel, mely szerint az A2AR hiányos timociták hasonló apoptotikus érzékenységet mutatnak dexametazonra, mint a vad típusú egerek timocitái. Ezek az adatok tehát azt mutatják, hogy az A2A receptoron keresztül zajló jelátvitel a

harmadik útvonal, mely hozzájárul a szöveti transzglutamináz felregulálásához a timocita apoptózis során *in vivo*.

## **AZ ADENOZIN EXTRACELLULÁRISAN KÉPZŐDIK AZ APOPTÓTIKUS SEJTEK FAGOCITÓZISA SORÁN**

Laborunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy sem a makrofágok, sem az apoptótikus timociták önmagukban nem termelnek adenzint detektálható mennyiségben. A termelődése akkor volt csak mérhető, ha a sejteket együtt inkubáltuk. Így az adenzin képződhetett a fagocitált apoptótikus sejt eredetű nukleotidok degradációja során intracellulárisan, vagy extracellulárisan, a makrofágok vagy az apoptótikus sejtek által kibocsátott adenin nukleotidok lebomlása során. Az extracelluláris adenzin képződés sebesség meghatározó lépése szabályozódhat az ekto-nukleozid trifoszfát difoszfohidrolázok által – mint a CD39, mely az ATP-t illetve ADP-t defoszforilálja AMP-vé  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  - függő módon –, illetve szabályozódhat az ekto-nukleotid pirofoszfátáz- foszfodieszteráz (NPP) család által, pl. NPP1 és 3, melyek szintén a sejtfelszínen lokalizálódnak, közvetlenül AMP-vé alakítják az ATP-t. Az AMP ezután gyorsan degradálódik adenzinná a szolubilis vagy membrán kötött ekto-5'-nukleotidázok által (pl. CD73). Korábbi eredményeink azt is megmutatták, hogy az apoptótikus sejtek fagocitálása megakadályozza a gyulladáskeltő citokinek termelődését, ilyen a KC és a MIP-2 (makrofág gyulladós protein-2). Ezért úgy döntöttünk, megvizsgáljuk a fagocitáló makrofágok citokin profilját CD73 inhibitor (MADP -  $\alpha,\beta$ , methylene-adenosine 5 diphosphate) jelenlétében. A fagocitózis önmagában nem változtatta meg a peritoneális makrofágok citokin mintázatát, de a CD73 aktivitás gátlása szignifikánsan emelte a KC és MIP-2 produkciót. A fagocitózis során termelődött citokinek mennyisége viszont nem nőtt akkor, ha MADP mellett NECA (nem metabolizálódó adenzin analóg) is jelen volt a rendszerben, mely arra utal, hogy a MADP hozzáadása valóban befolyásolja az extracelluláris adenzin produkciót. Adataink tehát arra utalnak, hogy az adenzin extracellulárisan képződik az apoptótikus sejtek eltakarítása során.

Az apoptótikus sejtek ATP-t bocsátanak ki, mely fontos szerepet játszik abban, hogy a makrofágok megtalálják az apoptótikus sejteket. A csatornát, mely kaspáz függő módon nyílik az apoptózis során, pannexin csatornaként azonosították. Az irodalomból tudjuk, hogy a pannexin-1 csatornákon keresztül kibocsátott adenin nukleotidok átalakulhatnak adenzinná, mely aztán triggereli az A2AR szignalingot a makrofágokban. A timociták expresszálják és aktiválják a pannexin-1 csatornákat az apoptózis során, ezért annak eldöntésére, hogy vajon az apoptótikus sejtek által termelt adenin

nukleotidok önmagukban is meghatározzák-e az adozin termelődést – amely aztán gátolja a gyulladásoos citokinek produkcióját, vagy szükség van a makrofágok hozzájárulására –, meghatároztuk a vad típusú vagy pannexin-1 hiányos apoptotikus timocitákat fagocitáló makrofágok gyulladásoos citokin termelését. Azt találtuk, hogy a pannexin-1 csatorna hiánya nincs hatással magára az apoptózisra, továbbá a pannexin-1 hiányos apoptotikus timocitáknak kitett makrofágok hasonló citokin profillal válaszolnak a vad típusú timocitáknak kitett makrofágokéhoz, amely arra utal, hogy a pannexin-1 csatorna hiányában is képződik adozin, mely aztán gátolni tudja a makrofágok gyulladásoos citokin termelődését. Ezért azt is megnéztük, a pannexin-1 hiányos timociták kibocsátanak-e ATP-t, és azt találtuk, hogy habár kevesebb, de a pannexin-1 hiányos sejtekből is szabadul fel ATP. Ez adódhat más csatornáknak, pl. konnexinek jelenlétéből, vagy mert a timociták szignifikáns része másodlagos nekrozison ment keresztül. Így végülis nem tudtuk eldönteni, hogy az adozin csak a timociták által kibocsátott nukleotidokból keletkezik, vagy hozzájárulnak-e a termelődéshez a makrofágok is, melyek ugyancsak képesek ATP-t kibocsátani bizonyos stimulusra.

## **A DNASE-SEQ ÉS CHIP-SEQ KOMBINÁCIÓJA LEHETŐVÉ TESZI A TGM2 LEHETSÉGES ENHANSZER KÉSZLETÉNEK AZONOSÍTÁSÁT**

A továbbiakban szerettük volna behatóan tanulmányozni a Tgm2 regulációját, azoknak a vegyületeknek az esetében, amelyeket a fentiekben meghatároztunk. Ismert, hogy a Tgm2 promóter többek között TGF- $\beta$  és retinoid válaszadó elemet tartalmaz, de eddig nem vizsgálták a gént körülvevő régiót. Ezért célul tűztük ki, hogy azonosítsuk és karakterizáljuk a Tgm2 regulációjában részt vevő lehetséges enhanszer régiókat egér timocitákban. Ehhez első lépésben publikusan elérhető DNáz és CHIP egér tímusz adatokat tanulmányoztunk.

Nemrégiben leírták, hogy a CTCF orientációja meghatározza a kromatin hurkot illetve elkülöníti egymástól a funkcionálisan különböző genomi régiókat. A CTCF motívum tandem orientációja lehetővé teszi az enhanszereknek hogy megtalálják a targetjeiket, így részt vesz a génregulációban, míg a konvergens motívum a magasabb rendű kromatin struktúra kialakításában játszik szerepet. A Tgm2 157 kb széles genomi régióján belül három nagy affinitású CTCF csúcsot találtunk. A motívumok orientációjának analízise egy konvergens motívum párt mutat a régió határain, és egy tandem motívumot a gén transzkripciósoos start helyén (TSS), mely a géntől 5' irányban lévő határon fellelhető CTCF motívummal van párban.

Ezek az adatok arra utalnak, hogy a Tgm2 gén regulációja ebben a genomi régióban történik meg. DNáz-szek adatok alapján számos hiperszenzitív helyet találtunk a Tgm2 gén környezetében, a tandem CTCF határokon belül és további egyet a konvergens motívumokon belül (a gén 3'UTR régiójában).

Mivel a DNáz-szek és ChIP-szek (H3K4me3, H3K4me1 and H3K27ac) adatok alkalmasak a lehetséges enhanszerek azonosítására, felhasználtuk hat (+30kb, TSS, -7.9kb, -13kb, -20kb, -28kb) hiperszenzitív hely tanulmányozására a gén környezetében, melyek a H3K4me3 és H3K4me1 nagyfokú feldúsulását mutatták. H3K4me3 az aktívan átíródó fehérje kódoló gének promóterében megtalálható hiszton módosítás, de sokszor enhanszereken is detektálható, amely az erős enhanszer/promóter interakciónak tudható be. H3K4me1 megjelöli a regulátor elemeket a genomban, legyenek azok aktívak, vagy inaktívak. A hat elem közül csak kettő (-13kb and -20kb) mutatott feldúsulást H3K27ac-ra, mely a funkcionálisan aktív enhanszereket jelöli. Így az ENCODE adatokat használva azonosítani tudtunk öt regulátor elemet, melyeket a továbbiakban részletes analízis alá vettünk.

## **A TGM2 LEHETSÉGES ENHANSZEREINEK ACETILÁCIÓS SZINTJE A TELJES TÍMUSZBÓL ILLETVE *IN VITRO* TIMOCITÁKBÓL HASONLÓ MINTÁZATOT MUTAT**

A tímusz különböző típusú sejtekből épül fel. Habár a timociták a tímusz sejtjeinek jelentős hányadát adják, marofágok, dendritius sejtek és epiteliális sejtek ugyancsak jelen vannak. Így a szignálok nemcsak egy sejttypusból származnak. Ezért timocitákat izoláltunk a tímuszból és az általunk mért adatokat összevetettük a publikusan elérhető adatokkal. ChIP-qPCR méréseink a Tgm2 enhanszerein hasonló mintázatot mutatnak az ENCODE teljes tímusz adatokkal, az *in vitro* timocitákban két (-13kb and -20kb) enhanszer volt erősen H3K27 acetilált. Ezzel párhuzamban azt találtuk, hogy ezeken a helyeken dúsult fel a két jól ismert hiszton acetiltransferáz P300 és CBP (CREB binding protein) is. Mivel pozitív korrelációt látunk a tímusz eredetű genom szintű adatok illetve az általunk mért *in vitro* timocita adatok között, elmondhatjuk, hogy méréseink összeegyeztethetőek a publikusan elérhető adatokkal, ezzel bizonyítva rendszerünk alkalmazhatóságát, megbízhatóságát.

## **AZ ENHANSZER RNS MÉRÉSEK MEGMUTATJÁK A TGM2 GÉN FUNKCIONÁLIS ENHANSZEREIT**

Hogy azonosítsuk vajon a feltételezett enhanszerek válaszolnak-e Tgm2 általam tanulmányozott induktoraira, elhatároztuk, hogy lemérjük a keletkező enhanszer RNS-eket (eRNS), amelyek az enhanszerekről keletkeznek, különböző kezelések hatására. Ezért az *in vitro* timocitákat 9cRA-val, TGF- $\beta$ -val illetve dbcAMP-vel kezeltük 1 órán át. Érdekes módon mindegyik regulátor elem válaszolt a 9cRA kezelésre, de csak kettő (-13kb and -20kb) szabályozódik TGF- $\beta$  vagy dbcAMP által.



Ismereteink a jelátviteli útvonalokról lehetővé teszik, hogy vizsgáljuk a szignál specifikus transzkripció faktorok kötését ezeken az elemeken. Ezért ChIP-qPCR méréseket végeztünk a CREB, SMAD4, RAR és RXR kötését vizsgálva, a fent említett aktivátorok jelenlétében. A dbcAMP kezelés hatékonyan rekrutálta a CREB-et az általunk vizsgált enhanszerekhez, de legmagasabb jeleket a -13 kb és -20 kb enhanszerek esetén tapasztaltuk. Továbbá szintén tapasztaltunk CREB feldúsulást 9cRA és TGF- $\beta$  kezelés esetén is, de a kötés ugyancsak a -13 kb és -20 kb esetén volt a legerősebb. A SMAD4 kötődését vizsgálva azt találtuk, hogy TGF- $\beta$  jelenlétében a rekrutálódás dinamikája hasonló mintázatot követ, a -7.9 b és -28 kb enhanszerek kivételével, melyek egyáltalán nem mutattak feldúsulást. RAR illetve RXR esetén, 9cRA jelenlétében nem tapasztaltunk erős feldúsulást, de mindenhol megfigyelhető volt a kötésük. Az eRNS mérésével párhuzamban ezek az adatok azt mutatják, hogy a RAR és RXR fehérjék jelentős része már kötve van a regulátor elemekhez, külsőleg adott agonista hiányában is, ahogy mások ezt előzőleg meg is mutatták.

Adataink tehát azt mutatják, hogy az általunk fejlesztett stratégia hatékonyan bizonyult a szignál szelektív enhanszerek azonosításában. A különböző enhanszerekről szintetizálódó eRNS-ek mérésével, kombinálva a transzkripció faktor kötési adatokkal, azonosítani tudtuk a Tgm2 öt szignál szelektív enhanszerét egér timocitákban.

## **A TGF- $\beta$ ÁLTAL INDUKÁLT JELÁTVITELI ÚTVONALAK SZELEKTÍVEN HOZZÁJÁRULNAK A RETINOID SZIGNALINGHOZ A TGM2 GÉNHEZ KAPCSOLHATÓ ENHANSZER ELEMÉKEN**

mRNS szinten már megmutattuk, hogy az adenilát cikláz és a TGF- $\beta$  mediált jelátviteli útvonalak szinergizálnak a retinoid szignallal a Tgm2-n, mely a gén fokozott kifejeződéséhez vezetett. Ezért úgy döntöttünk tesztelni fogjuk, vajon a TGF- $\beta$  szignaling aktivációja hozzájárul-e a retinoid mediált jelátviteli útvonalhoz a Tgm2 reguláció kontextusában. Annak érdekében, hogy azonosítsuk, mely enhanszer elemeken történik meg a két útvonal kollaborációja, meghatároztuk a képződő eRNS szintjét különböző szignál kombinációkban. Szignifikánsan növekedett eRNS expressziót detektáltunk a -7.9 kb, -13 kb, -20 kb enhanszerek esetében, ha a TGF- $\beta$  és 9cRA együtt volt jelen, ami arra utal, hogy a TGF- $\beta$  és retinoid útvonalak kollaborációja ezeken az elemeken valósul meg.

Hogy részletesebben vizsgálhassuk ezt az együttműködést, kromatin immunprecipitációt végeztünk, melyet qPCR mérés követett. Amíg az RXR kötés esetén csak kis növekedés látható 9cRA jelenlétében, szignifikáns növekedés volt megfigyelhető a -7.9 kb, -13 kb és -20 kb enhanszereken,

ha TGF- $\beta$  is jelen volt a rendszerben. Érdekes módon a két szignál együttes adása a SMAD4 rekrutálódását is erősítette. Mi több, a P300 és CBP koaktivátorok ugyancsak jobban kötődtek TGF- $\beta$ /9cRA jelenlétében.

Adataink azt sugallják, hogy a két szignál együttes alkalmazása esetén a -7.9 kb, -13 kb és -20 kb enhanszereken megnő ezeknek a transzkripció faktoroknak a hozzáférhetősége, amely egy növekedett koaktivátor kötéshez vezet, így teszi hatékonyabbá a transzkripciót.

### **RAR/RXR HETERODIMEREK LÉPNEK INTERAKCIÓBA A TGF- $\beta$ SZIGNALINGGAL A -13 KB ÉS -20 KB ENHANSZEREKEN**

Ismerve a tény, hogy a 9cRA aktiválni képes számos RXR heterodimert, többek között a RAR/RXR-t, szelektív szintetikus agonistát használtunk a RAR $\alpha$  -ra (AM580) és RXR-re (LG268), hogy azonosítsuk a TGF- $\beta$  és retinoid szignaling közötti együttműködés célpontjait az integrátor enhanszereken (-13kb and -20kb). Azt találtuk, hogy mind a RAR $\alpha$ , mind az RXR agonista önmagában is szignifikánsan képes emelni az enhanszer transzkriptek szintjét ezeken az enhanszereken. Érdekes módon, mikor az agonisták mellé TGF- $\beta$ -t adtunk, fokozott eRNS produkciót kaptunk mindkét agonista esetén. A TGF- $\beta$  szignaling tehát képes erősíteni a RAR/RXR heterodimer transzkripcionális aktivitását, amely párhuzamban van azzal, amit a RAR és RXR kötése esetén tapasztaltunk az integráron enhanszerek esetében.

Annak kiderítésére hogy esetleg más RXR heterodimer is kölcsönhatásba lép e a TGF- $\beta$  szignalinggal, pán-RAR antagonistát (AGN194310) alkalmaztunk. Azt tapasztaltuk, hogy az AGN194310 képes volt redukálni az LG268/TGF- $\beta$  és AM580/TGF- $\beta$  által indukált eRNS szintet a TGF- $\beta$ /AGN194310 által indukált eRNS expresszió szintjére, ami arra utal, hogy leginkább RAR/RXR heterodimerek lépnek interakcióba a TGF- $\beta$  szignalinggal.

### **A RETINOID SZIGNALINGOT AZ ADENILÁT CIKLÁZ ÚTVONAL IS KÉPES ERŐSÍTENI A TGM2 ENHANSZER ELEMÉIN**

Előzőekben megmutattuk, hogy az adenilát cikláz útvonal hozzájárul a transzglutamináz 2 kifejeződéséhez mRNS és fehérje szinten, *in vivo* és *in vitro* timocitákban. Továbbá *in vitro* azt is megmutattuk, hogy a dbcAMP hozzáadása fokozza a 9cRA Tgm2 expresszióra kifejtett hatását. Most arra voltunk kíváncsiak, a két útvonal szinergizál-e a Tgm2 enhanszer elemein. DbcAMP és 9cRA együttes

alkalmazása esetén eRNS szinten növekedést tapasztaltunk a -13 kb enhanszeren, de szignifikáns növekedést csak a -20 kb enhanszer esetében, mely arra utal, hogy az adenilát cikláz és a retinoid útvonal ezeken az enhanszereken működik együtt. Vizsgálva az RXR, CREB, P300 és CBP kötését azt találtuk, hogy az adenilát cikláz útvonal szignifikánsan nem segíti ezeknek a faktoroknak a rekrutálódást a Tgm2 enhanszereihez.

Tehát, míg a TGF- $\beta$ /retinoid szignaling esetében fokozott enhanszer hozzáférhetőséget tapasztaltunk az RXR, CREB, P300 és CBP kötése esetében, nem volt emelkedés ezen faktorok kötésében az adenilát cikláz/retinoid szignaling esetén.

### **A KROMOSZÓMA KONFORMÁCIÓ VIZSGÁLATA (3C) FELFEDI AZ INTERACIÓT A -20 KB ENHANSZER ÉS A TGM2 GÉN KÖZÖTT**

Annak érdekében, hogy bizonyítsuk az azonosított enhanszerek és a Tgm2 gén közötti interakciót, kromoszóma konformáció vizsgálatot végeztünk. Kiválasztottuk a gén +11 kb és a +30 kb (3'UTR) régióit, amelyek DNáz hiperszenzitívek voltak, és egy kontroll régiót a gén TSS-étől +13 kb-ra, amely egy gyengén hozzáférhető régió. A módszer limitációja, hogy a HindIII hasító helyek ezeknek a helyeknek a vizsgálatát teszi lehetővé a -20 kb enhanszerrel. A módszer viszont alkalmasnak bizonyult arra, hogy megmutassuk az interakciót ezek között a régiók között. Ahogy vártuk, a -20 kb enhanszer interakcióba lép a +11 kb és +30 kb DNáz hiperszenzitív helyekkel, de nincs kapcsolatban a +13 kb kontroll régióval. Ezek az interakciók viszont nem mutattak indukálhatóságot az alkalmazott kezelések esetén, amely arra utal, hogy ezek stabil, állandó hurkok az enhanszer és a gén között.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Az apoptózis egy fiziológias folyamat, kritikus a feleslegessé vált, vagy veszélyt jelentő sejtek eliminálásában. Nap mint nap több milliárd sejt hal el apoptózissal és takarítódik el a professzionális fagociták által, anélkül, hogy gyulladás alakulna ki. A sejthalál program egyik fontos résztvevője a transzglutamináz 2 (TGM2), amely egy multifunkcionális enzim, kritikus szerepet játszik az apoptotikus sejtek megfelelő felismerésében, eltakarításában, továbbá megakadályozza a gyulladás-keltő sejtartalom kijutását. Az enzim kifejtődése erősen megnövekszik a T-sejtek apoptózisa során a tímuszban. Az egér tímusz apoptotikusan meglehetősen aktív, mivel a sejtek több mint 90%-a elhal érésük és differenciálódásuk során. Emiatt az egér tímusz eredetű apoptotikus timociták kiváló modellrendszert nyújtanak a TGM2 enzim szabályozásának tanulmányozásához olyan molekulák részvételével, amelyek jelen vannak a timikus környezetben *in vivo*.

A disszertáció első részében azt vizsgáltam, hogy a tímuszban jelen lévő, makrofágok által szekretált molekulák, mint például a TGF $\beta$ , adozin és retinoidok hogyan járulnak hozzá a TGM2 kifejeződéséhez génextpressziós szinten. Azt találtuk, hogy az adozin együttműködik a TGF $\beta$  és a retinsav által aktivált jelátviteli utakkal, ezáltal szignifikánsan növeli a Tgm2 gén kifejeződését az elhaló timocitákban *in vitro*. Továbbá, az adozin az adozin A2A receptor – adenilát cikláz útvonalon keresztül fejti ki hatását, hozzájárul a TGM2 gén és fehérje szintű kifejeződéséhez *in vivo*. Azt is megmutattuk, hogy az adozin extracellulárisan keletkezik az apoptotikus timociták eltakarítása során, részben adenin nukleotidokból, amelyek a pannexin-1 csatornákon keresztül jutnak ki, mely egy újfajta együttműködésre világít rá a makrofágok és az apoptotikus sejtek között.

A munkám második részében bemutattam, hogy a tímuszban jelenlévő mediátorok hogyan regulálják a Tgm2 gén kifejeződését különböző intergenikus regulátor elemeken. Az intergenikus szabályozó elemek szerepe eddig tisztatlan volt a Tgm2 esetében a timocitákban. Hogy túllépünk a technikai korlátokon, az ENCODE konzorcium által generált teljes genom szintű CHIP-seq és DNase-seq adatokat használtunk, melyek kombinálásával feltártuk a gén lehetséges regulátor elemeit illetve enhanser-specifikus RNS transzkriptek (eRNS) mérésével azonosítottuk azokat, amelyek funkcionálisan fontosak lehetnek a gén regulációja szempontjából. Munkánk egy újfajta stratégiát nyújt arra, hogyan azonosítsuk és karakterizáljuk egy gén szignál specifikus, funkcionális enhanser készletét, teljes genom szintű adatokat használva és eRNS molekulák produkcióját mérve.



**DEBRECENI EGYETEM**  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/142/2016.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sándor Katalin  
Neptun kód: LMPHZ6  
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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. "Accepted by Publisher" (2016)*  
IF:6.332 (2014)
2. **Sándor, K.**, Pallai, A., Dúró, E., Legendre, P., Couillin, I., Sággy, T., Szondy, Z.: Adenosine produced from adenine nucleotides through an interaction between apoptotic cells and engulfing macrophages contributes to the appearance of transglutaminase 2 in dying thymocytes.  
*Amino Acids. Epub ahead of print (2016)*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2257-5>  
IF:3.293 (2014)





**DEBRECENI EGYETEM**  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



---

**További közlemények**

3. Hsieh, Y., Liu, G., Lee, Y., Yang, J., **Sándor, K.**, Sarang, Z., Bononi, A., Pinton, P., Tretter, L., Szondy, Z., Tsay, G.J.: Transglutaminase 2 Contributes to Apoptosis Induction in Jurkat T Cells by Modulating Ca<sup>2+</sup> Homeostasis via Cross-Linking RAP1GDS1. *PLoS One*. 8 (12), 14 p., 2013.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081516>  
IF:3.534

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,159**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 9,625**

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

Debrecen, 2016.06.08.



## AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ PREZENTÁCIÓK

ANGOL NYELVŰ ELŐADÁS:

*Adenosine derived from engulfing macrophages increase the expression of transglutaminase 2 in apoptotic thymocytes via adenosine A2A receptors*

8. Molekuláris és Immunbiológiai 'Winter School', Debrecen, 2015. január 8-10.

*Transcriptional control of transglutaminase 2 expression in apoptotic thymocytes*

9. Molekuláris és Immunbiológiai 'Winter School', Debrecen, 2016. január 8-9.

MAGYAR NYELVŰ ELŐADÁS:

*Intracelluláris cAMP szintet növelő vegyületek hatásának vizsgálata a transzglutamináz 2 enzim kifejeződésére egér timusz sejtekben*

Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola (KODI) és a Fogorvostudományi Doktori Iskola (FODI) 2014. évi szimpóziuma – Debrecen, 2014. június 16.

POSZTEREK:

*Compounds enhancing intracellular cAMP levels increase the expression of transglutaminase 2 in mouse thymocyte*

7. Molekuláris és Immunbiológiai 'Winter School', Galyatető, 2014. január 7-10.

*Compounds enhancing intracellular cAMP levels increase the expression of transglutaminase 2 in mouse thymocyte*

22nd Conference of the European Cell Death Organization, Hersonissos, Crete, Greece, 2014.