

**AZ APOPTÓTIKUS SEJTEK GYULLADÁSCSÖKKENTŐ
HATÁSAIT LÉTREHOZÓ LEHETSÉGES MECHANIZMUSOK
VIZSGÁLATA**

PALLAI ANNA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2016

AZ APOPTÓTIKUS SEJTEK GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁSAIT LÉTREHOZÓ LEHETSÉGES MECHANIZMUSOK VIZSGÁLATA

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

ÍRTA: PALLAI ANNA

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. BUZÁS EDIT, AZ MTA DOKTORA PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA
A Doktori Szigorlat Időpontja, Helye:	2015. December 4. 11:00 Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati Tanszék, Dékáni Tárgyaló
Az Értekezés Bírálói:	PROF. DR. DUDA ERNŐ, AZ MTA DOKTORA PROF. DR. SIPKA SÁNDOR, AZ MTA DOKTORA
A Bírálóbizottság Elnöke:	PROF. DR. MATESZ KLÁRA, AZ MTA DOKTORA
A Bírálóbizottság Tagjai:	PROF. DR. BUZÁS EDIT, AZ MTA DOKTORA PROF. DR. DOMBRÁDI VIKTOR, AZ MTA DOKTORA PROF. DR. DUDA ERNŐ, AZ MTA DOKTORA PROF. DR. SIPKA SÁNDOR, AZ MTA DOKTORA

Az Értekezés Védésének Időpontja:	2017. Január 10. 13:00
Az Értekezés Védésének Helye:	DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1. APOPTÓTIKUS SEJTEK ELTÁVOLÍTÁSA

A legtöbb sejtípus korlátozott élettartammal rendelkezik, mely fiziológiailag az apoptózis, vagy másnéven, programozott sejthalál folyamatán keresztül ér véget. Az elhaló sejtek apoptózisa és eltakarítása fontos és lényeges élettani szerepet játszik nemcsak az embrionális fejlődésben, hanem a normál szöveti megújulásban, szöveti átrendeződésben, az immun-homeosztázis fenntartásában és a gyulladás megszűnésében is. Normál körülmények között az apoptótikus sejtek felvétele gyorsan és hatékonyan zajlik a professzionális fagociták (mint például makrofágok és éretlen dendritikus sejtek) által, illetve a szomszédos sejtek (fibroblasztok és epiteliális sejtek) segítségével anélkül, hogy ez gyulladást, vagy immunválaszt váltana ki.

Az apoptótikus sejtfelvétel gyulladáscsökkentő hatásai

Míg a különböző patogének - baktériumok, illetve vírussal fertőzött sejtek - fagocitózisa gyulladásí választ idéz elő makrofágokban, addig az apoptótikus sejtek felvétele gyulladáscsökkentő fenotípust indukál. Mindezt az apoptótikus sejtek nem csupán a gyulladások szignálok hiányával érik el, hanem azzal, hogy olyan jelátviteli útvonalakat kapcsolnak be a makrofágokban, melyek aktívan befolyásolják a gyulladás programját. Apoptótikus sejtekkel történő előinkubálás makrofágokban erősen gátolja a lipopoliszacharid (LPS) - Gram negatív baktériumok sejtfalának komponense – által kiváltott Toll-like receptor 4-en (TLR4) keresztül gyulladásí választ.

Ezt követően a makrofágok szolúbilis mediátorokat szabadítanak fel, melyek parakrin vagy autokrin módon erősítik és fenntartják a gyulladáscsökkentő választ. LPS által stimulált makrofágok apoptótikus sejtfelvétele fordított arányban befolyásolja a TNF- α , IL-1 β és IL-12 gyulladásí citokinek szekrécióját összevetve az IL-10 átmeneti felszabadulásával. Ehhez hasonló összefüggést tapasztalunk a TGF- β , vértelenke-aktiváló faktor és a PGE2 szekréciója, valamint a TNF- α , IL-1 β és számos más gyulladásí citokin felszabadulása között apoptótikus sejtet felvett makrofágok esetében.

Az apoptótikus sejtek emésztése során felszabaduló lipidek (zsírsavak, oxiszte-rolok) endogén ligandként működve képesek aktiválni a makrofágok lipid érzékelő receptorait (LXR α és β , PPAR γ és δ , PPAR-ok). Az apoptózissal elhalt sejtek bekebelezése során fellépő nukleáris receptor aktiváció a fagocita receptorok (pl. MerTK, CD36), a TG2 és az opszoninok (pl. MFG-E8, C1qb, Gas6 és trombospondin) upregulációjához, valamint a fagocita metabolizmus fokozásához vezet.

1.2. ADENOZIN

Az adenzin az endogén purin nukleozidok közé tartozó vegyület. Sejtekből történő felszabadulása, vagy extracelluláris keletkezése után a környező sejtek membránjába diffundál, ahol kötődik a receptorához.

Az extracelluláris adenzin termelésben számos sejtípus vesz részt. Fertőzés, gyulladás, metabolikus és hipoxiás stressz során az endotél sejtek és a neutrofilek hatalmas mennyiségű adenzint bocsátanak ki. Emellett az aktivált makrofágok (pl. LPS kezelés után) ATP kibocsátásuk által szintén fontos adenzin források.

Adenzin receptorok és jelátviteli útvonalak

Az adenzinnak négy receptor altípusa ismert, melyek mindegyike G-fehérjéhez kapcsolt (GPCR) és kifejeződik a makrofágok által. Ezen receptorokhoz tartozó gének feltérképezése részletesen megtörtént, mely alapján az altípusok a következő jelöléseket kapták: A_1 (A_1R), A_{2A} (A_{2AR}), A_{2B} (A_{2BR}) és A_3 (A_3R).

A Gi-kapcsolt adenzin A_1 receptor az adenzin 10^{-10} – 10^{-8} M koncentrációjánál kapcsol be, és közvetíti az intracelluláris ciklikus AMP (cAMP) szint csökkenését. A Gs-kapcsolt adenzin A_{2A} és A_{2B} receptorok aktiválásához az adenzin magasabb (sorrendben: 5×10^{-7} M és 1×10^{-5} M) koncentrációja szükséges, és ezáltal közvetíti a cAMP szint növekedését. A Gi-kapcsolt adenzin A_3 receptorok az adenzin 10^{-6} M koncentrációjánál aktiválódnak, és közvetíti az adenilát-cikláz gátlását. Nagy affinitású tehát az A_1 , A_{2A} és A_3 receptor altípusok, melyek alacsonyabb adenzin koncentrációnál is képesek aktiválódni, míg az alacsonyabb affinitású A_{2B} receptor stimulálásához magasabb koncentráció szükséges.

Az adenzin immunmoduláló hatásai

Az adenzin extracelluláris hírvívő molekulaként számos sejtípusban, szövetben és szervben lehet különböző biológiai folyamatok modulátora. A szív és érrendszer, a gyomor-bél traktus, a központi idegrendszer és az immunrendszer normál működésében is jelentős szerepet játszik. A központi idegrendszer ingerületátvitelében az adenzin gátló neurotranszmitterként működik. Fiziológias körülmények között az adenzin részt vesz az idegrendszer kialakulásában és a neuronhálózat éresi folyamatában, a megismerés és emlékezés folyamatában, valamint az alvás és ébredés szabályozásában. Az adenzin szív és érrendszerben betöltött szerepei közé sorolható az értágító, antitrombikus, vérnyomás- és szívfrekvencia csökkentő hatása.

Az immunrendszer számos sejttípusa fejezi ki az adenzin receptorokat, melyeken keresztül az adenzin a veleszületett immunválasz széles spektrumát képes modulálni. Erre lehetnek példák a következők:

- Adenzin receptor ligálás monocitákon vagy makrofágokon gátolja az IL-12 termelését LPS kötődése során Toll-like receptor 4-en keresztül. Adenzin A_{2A} receptor stimulálása a TLR-4 indukált TNF- α , MIP-1 α , és NO felszabadulás csökkenéséhez vezet és fokozza a gyulladáscsökkentő citokin IL-10 termelését. Broussas és munkatársai megvizsgálták, hogy az adenzin A_3 receptor altípusához való kötődésén keresztül gátolja a szöveti faktor felszabadulását LPS-stimulált humán monocitákból. Az adenzin fokozza a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) termelését makrofágokból, ezáltal megkönnyíti az angiogenezis (véredényképződés) folyamatát.
- Metabolikus stressz során, TLR aktiváció nélkül, az adenzin az A_1 és A_3 receptorok kötődésén keresztül kemotaktikus molekulaként hatva elősegíti az éretlen humán dendritikus sejtek kemotaxisát, és növeli az intracelluláris kalcium koncentrációt, valamint az aktin átszerveződést. Mindemellett azonban az érett plazmacitoid dendritikus sejtek felszínén kifejeződő adenzin A_{2A} receptor aktiválása a citokin (IL-6, IL-12 és IFN- α) termelés csökkenéséhez vezet CpG oligodeoxinukleotid általi aktiváció ellenére is.
- Az olyan krónikus gyulladásos állapotokban, mint az asztma és a krónikus obstruktív légúti betegség (COPD), a humán hízósejteken kifejeződő A_{2B} és A_3 receptorok adenzin általi aktivációja azok degranulációját okozza, valamint hisztamin, prosztaglandinok, leukotriének, szerotonin, gyulladásos citokinek (IL-4 IL-13, IL-8, IL-1 β), angiogén faktorok (IL-8 és VEGF), kemokinek és különböző szövetkárosító enzimek, proteázok felszabadulását váltja ki.
- Az adenzin A_1 receptor aktivációja kemotaxist indukál, és növeli a neutrofilek endotéliumhoz történő tapadását. Miközben az adenzin A_{2A} receptor stimulációja csökkenti a neutrofil adherenciáját, szétkapcsolja a kemoattraktáns receptorokat a stimulus-transzdukciós proteinektől, és gátolja a mérgező szabad gyökök szintézisét.
- Az adenzin az A_3 receptorok stimulálása révén növeli az NK-sejtek tumorelleses aktivitását.

1.3. TNF BIOLÓGIA ÁLTALÁNOS SZEMPONTJAI

Körülbelül 30 évvel ezelőtt, egy szolúbilis citokint azonosítottak, melyet tumor nekrozis faktornak (TNF) neveztek el, mely az immunrendszer aktiválódása során termelődik, képes jelentős citotoxicitást számos tumor sejtvonalon kifejteni, és tumor nekrozist okozni bizonyos állati modell rendszerekben.

TNF- α szerkezete és szintézise

A humán TNF- α egy 27-kDa-os (233 aminosav) fehérjeként fejeződik ki. II típusú transzmembrán fehérje, rendezett stabil homotrimerekben. A 27-kDa-os membrán-integrált formából (mTNF- α) metalloproteáz TNF-alfa konvertáló enzim (TACE) proteolitikus hasításán keresztül a 17-kDa-os szolúbilis homotrimer (sTNF) szabadul fel.

A TNF- α egy pleiotróp citokin, számos sejttípus termeli a szervezetben, monocita sejtvonal - mint a makrofágok, asztroglia, mikroglia, Langerhans-sejtek, Kupffer-sejtek, és az alveoláris makrofágok - az elsődleges termelői.

TNF receptorok

TNF ligand család tagjai biológia funkciójukat rokon membrán receptoraik kölcsönhatásán keresztül fejtik ki. A TNF receptor család tagjai közé tartozik: TNF receptor 1 (TNF-R1), más néven CD120a, p55 vagy p60, TNF receptor 2 (TNF-R2), más néven CD120b, p75 vagy p80, Fas antigén, CD27, CD30, CD40, 4-1BB és számos más receptorok.

A TNF-R1 konstitutíven a legtöbb szövetben kifejeződik, míg a TNF-R2 expressziója erősen szabályozott és jellemzően az immunrendszer sejtjeiben található meg. A sejtek túlnyomó többségében, a TNF-R1 a TNF jelátvitel kulcsfontosságú mediátoraként jelenik meg, míg a TNF-R2 úgy tűnik, hogy fő szerepet játszik a limfoid rendszerben.

TNF- α jelátvitel és biológiai szerepe

A TNF család tagjai kétirányú jelet indíthatnak. Míg az egyik oldalon, a TNF-TNFR kölcsönhatások kezdeményeznek többszörös jelátviteli útvonalakat elősegítve a sejt túlélést, a sejtthálát, differenciálódást vagy a gyulladást a TNFR-kifejező sejtekben, addig a TNF-R család tagjai ligandként is kifejeződnek, melyek kezdeményezik a fordított jelátvitelt, szabályozva a sejtprolifерációt, citokin szekréciót, oxidatív burst-t, és T sejt érést.

A transzmembrán TNF- α úgy viselkedik, mint egy ligand kötődik a TNF- α receptorokhoz, valamint úgy működik, mint egy receptor, amely kívülről-befelé (fordított) jeleket továbbít a transzmembrán TNF- α -t hordozó sejtbe.

Erős gyulladásos és immunstimuláló aktivitásoknak köszönhetően, a TNF általában számos autoimmun betegségek progressziójának fontos mediátora. Fontos példák, a reumatoid arthritis és gyulladásos bélbetegség (Crohn-betegség), ahol szignifikáns klinikai javulást lehet elérni, ha a betegeket TNF neutralizáló vegyületekkel kezeljük.

Terápiában használt TNF- α ellenes vegyületek

Annak ellenére, hogy a TNF- α fontos a normális homeosztatikus mechanizmusokban, beleértve gazdaszervezet védelmét, a TNF- α rosszszabályozott termelését számos gyulladásos betegségben kimutatták. Továbbá, a TNF- α -aktivált makrofágok számos autoimmun betegség immunpatológiájának fő összetevői, beleértve reumás ízületi gyulladás, gyulladásos bélbetegség, arthritis psoriatica, a spondylitis ankylopoetica, fiatalkori krónikus arthritis, atherosclerosis és szepszis.

Napjainkban öt gyógyszer (TNF- α -gátló vegyületek) jelenleg engedélyezett bizonyos betegségek kezelésére. Ez az öt gyógyszer a következő: 1) etanercept, egy rekombináns humán szolúbilis TNF-R2 IgG Fc részéhez kapcsolt fúziós fehérje; 2) infliximab, egy anti-TNF humán-egér kiméra IgG1 monoklonális antitest; 3) adalimumab, egy humán anti-humán TNF- α antitest; 4) certolizumab pegol egy PEGilált TNF- α antitest; és 5) golimumab, egy humán anti-TNF- α IgG1 κ monoklonális antitest, amely beadható betegeknél. Ezek a gyógyszerek közel egyenlően neutralizálják a TNF- α -t, azonban jelentős különbségek mutathatók ki abban, mely betegségekre hatásosak. Ez arra utal, hogy a TNF- α neutralizálása mellett más hatások is megszabják a terápiás eredményeket.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során két makrofág sejtfelszíni receptor (adenosine A_3 receptor, mTNF- α) lehetséges szerepét kívántuk vizsgálni az apoptótikus sejtfelvétel gyulladáscsökkentő hatásaiban makrofágokon. A fő célkitűzéseink a következők voltak:

1. Ismert, hogy az adenoszin apoptótikus sejteket fagocitált makrofágok által termelődik adenin-nukleotidból, és adenoszin A_{2A} R-függő módon fejt ki gyulladáscsökkentő hatásait. Jelen tanulmányban az adenoszin A_3 R szerepét vizsgáltam az apoptótikus sejteket fagocitáló makrofágok gyulladásos válaszában szabályozásában.
2. Mivel az apoptótikus sejtfelvételtől és a mTNF- α jelátviteltől egyaránt kimutatták, hogy gátolják az LPS által kiváltott gyulladásos citokin termelést, vizsgálni kívántuk, hogy vajon az apoptótikus sejtek fokozzák-e az mTNF- α gátló hatását. Mivel az mTNF- α jelátviteltől nem tudunk sokat, ezért úgy döntöttünk, azonosítjuk annak jelátviteli elemeit.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Kísérleteinket 3 hónapos vad típusú, adenosin A_{2A} és A₃ receptor hiányos egereken végeztük.

A kísérletek második részében 2 hónapos NMRI him egereket, míg egyes kísérletekben TNF- α hiányos him egereket használtunk, melyeket éteres érzéstelenítéssel altattunk el. Az egereket specifikus kórokozóktól mentes helyen tartottuk, minden állatkísérlet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével történt.

Sejtkultúrák tenyésztése

A makrofágokat steril fiziológiás sóoldattal történő hasüregi mosással nyertük. A sejteket 2 napon keresztül RPMI 1640 tápfolyadékban (10% FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM Na-piruvát, 50 μ M 2-merkaptoetanol, 100 U/ml penicillin/100 μ g/ml sztreptomicin), termosztátban (37°C, 5% CO₂) tenyésztettük. A le nem tapadt sejteket az izolálás után 3-4 órával, majd naponta lemostuk.

Csontvelői sejtekből differenciáltott makrofágok (BMDM) esetében, a 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 μ g/ml sztreptomicin) GM-CSF jelenlétében (10% L929 fibroblaszt sejtfelülszó) termosztátban (37°C, 5% CO₂) 7 napon keresztül tenyésztettük. RAW264.7 sejteket DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, mely L-glutamint (2 mM), penicillint (100 U/ml), sztreptomicint (100 μ g/ml) és 10% FBS-t tartalmazott. Humán perifériás vér mononukleáris sejteket sűrűséggradiens (Ficoll-Paque Plus) centrifugálással izoláltuk buffy coatból, melyet egészséges önkéntesekből állók véréből gyűjti a debreceni véradási centrum. Buffy coat-ra az engedélyt (RKEB 3582-2012) a Regionális Kutatásügyi Bizottsága adta. CD14⁺ sejteket elválasztottuk mágneses MACS-al, majd mostuk PBS-sel, amely 0.5% BSA-t és 2 mM EDTA-t tartalmazott. Frissen izolált monocitákat 5 napig tenyésztettük IMDM tápfolyadékban (10% AB szérum és 5 ng/ml M-CSF), hogy megkülönböztessük őket a makrofágoktól.

Timocita apoptózis kiváltása *in vitro*

A timocitákat 4 hetes vad típusú vagy pannexin hiányos egerekből nyertük. Az izolált timocitákat (10⁶⁻⁷sejt/ml) 18 vagy 24 órán keresztül RPMI 1640 tápfolyadékban (penicillin/sztreptomicin) szérum hiányában tenyésztettük. Ez a módszer 80% feletti apoptotikus sejtet eredményezett (propidium-jodid/annexin V-FITC festéssel). Néhány kísérletben az apoptózist 0.1 μ M

dexametazonnal vagy 5 ng/ml forbol-dibutirát és 1 µg/ml ionomicin kombinációjával váltottuk ki. Az apoptotikus sejteket 10:1 (apoptotikus sejt : makrofág) arányban használtuk.

Adenozin A₃ receptor expressziójának meghatározása a sejtfelszínen

Vad típusú és A₃R hiányos hasüregi makrofágokat együtt inkubáltuk apoptotikus timocitákkal 1 órán át 1:10 arányban. A tápfolyadék eltávolítása és az apoptotikus sejtek lemosása után a makrofágokat inkubáltuk további 1, 3 és 5 órán át. A kezelések után a makrofágokat lemostuk (1xPBS), összegyűjtöttük és blokkoltuk 50% FBS-sel 30 percig majd anti-egér A₃R 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.

Adenozin A₃ receptor mRNS expressziójának meghatározása

Vad típusú hasüregi makrofágokat együtt inkubáltuk különféle célsejt típusokkal: apoptotikus, élő és hővel előlt (45 perc, 55°C) vagy anti-CD3-előkezelt (10 µg/ml, 20 perc) adenozin A₃ hiányos timocitákkal 1 órán át 1:10 arányban. Apoptotikus sejtek mosása és a tápfolyadék cseréje után az mRNS-t begyűjtöttük 2 óra múlva.

Adenozin A₃ receptor fehérje szintjeinek meghatározása

A hasüregi makrofágokat homogenizáltuk jéghideg 0.5%-os Triton X-100-at 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 gélen végeztük. Az elválasztott fehérjéket átvittük egy Immobilon-P transzfer membránra és vizsgáltuk anti-egér A₃R antitest felhasználásával. A₃R szignál detektálásra HRP-jelölt anti-kecske antitesteket használtunk. A fehérje sávokat Immobilon Western kemilumineszcens HRP szubsztráttal tettük láthatóvá.

A citokin termelés meghatározása

Vad típusú és A₃R hiányos hasüregi makrofágokat 24-lyukú tenyésztőedényre tettünk (1×10⁶ sejt/lyuk). A makrofágok citokin termelésének meghatározására, a makrofágokat (A₃R^{+/+} vagy A₃R^{-/-}) apoptotikus sejtekkel 1 órán át A₃R-szelektív agonista IB-MECA (10 µM) vagy A₃R-szelektív inhibitor MRS1523 (10 µM) jelenlétében vagy hiányában inkubáltuk. Ezután az apoptotikus sejteket lemostuk, a vegyületeket újra hozzáadtuk és a makrofágokat további 5 órán át inkubáltuk.

A sejtfehlőszo citokin tartalmát a különféle kísérletekben eger citokin array segítségével vizsgáltuk. A pixel sűrűséget az array egyes pontjában ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg. KC, MIP-2, TNF- α , IL-6 és TGF- β citokinek szintjét ELISA kit segítségével mértük. TGF- β esetében a fehlőszo sav-aktivált kezelésnek vetettük alá, a gyártó utasításai szerint.

Fagocitózis vizsgálata

A makrofágok által fagocitált apoptotikus sejtek vizualizálására, a makrofágokat 2-lyukú kamrába tettük (5×10^5 sejt/lyuk koncentrációban) és tenyésztettük 48 órán át festés előtt, majd megfestettük egy éjszakán át 10 μ M 5-6-(((4-klorometil)benzoi)amino)-tetrametilrodamin (CMTMR) festékkel, míg a timocitákat egy éjszakán át (6 μ M) 6-karboxi-3,6-diacetilfluoreszcein (CFDA) festékkel. A makrofágokat együtt inkubáltuk a CFDA jelölt apoptotikus sejtekkel 30 percig, majd a sejteket lemostuk és fixáltuk etanol/aceton (1:1) keverékével 10 percig -20°C-on. Olympus FV1000 konfokális lézerpásztaó mikroszkóppal felvételeket készítettünk. 500 sejtet számoltunk az apoptotikus sejtfehlés során minden eger kísérletben.

A makrofágok által fagocitált apoptotikus sejtek NO termelésének meghatározása

Vad típusú vagy A₃R hiányos makrofágokat inkubáltunk 1 órán át apoptotikus sejtekkel. A fehlőszo eltávolítottuk és a makrofágokat további 1 órán át inkubáltuk. A sejteltúra fehlőszoiból NO termelést néztünk, nitrit mérésével, ami a NO stabil oxidációs terméke, Griss-Ilosvay módszerrel.

Immunhisztokémia

BMDM és RAW264.7 makrofágokat (1×10^6) PBS-ben mostuk, majd fixáltuk acetonban (15 percig, -20°C-on) az immunfestés előtt. A PBS-es mosás után, a mintákat inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán át FITC jelölt anti-eger TNF- α vagy FITC jelölt patkány IgG1 izotípus antitestekkel. Ezután a mintákat mostuk PBS-ben és inkubáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten DAPI-val (1:600). Mosás és fedés után, a PBS-glicerol mintákat Olympus mikroszkóp segítségével vizsgáltuk és számítógép képelemzővel analizáltuk (nagyítás, x600).

TNFR I és II expressziójának meghatározása az apoptotikus timociták sejtfehlésén

A kontroll és apoptotikus timocitákat lemostuk PBS-sel, inkubáltuk PE-jelölt anti-eger TNFR I és II antitestekkel vagy az izotípus kontrollukkal 30 percig szobahőmérsékleten, aztán lemostuk és fixáltuk 1%-os paraformaldehiddel. A megfestett sejteket FACSCalibur-on vizsgáltuk. Az eredményeket WinMDI 2.9 szoftverrel értékeltük ki.

Immunfluoreszcens festés és konfokális mikroszkópia

BMDM sejteket 8-lyukú kamrába tettük (2.5×10^5 /lyuk) és tenyésztettük 7 napig. A sejteket kezeltük 100 ng/ml LPS-sel 1 órán át. A makrofágok által fagocitált apoptotikus sejteket (1:5) megfestettük egy éjszakán át 10 μ M CMTMR-rel 30 percig, majd a sejteket lemostuk HEPES pufferrel és fixáltuk metanol/aceton (1:1) keverékével 10 percig -20°C -on. A makrofágokat blokkoltuk 10%-os normál szarummal HEPES pufferben 2 órán át, aztán lemostuk jéghideg HEPES pufferrel kétszer és megfestettük kecske anti-egér TNF- α elsődleges antitesttel éjszakán át 4°C -on. Három mosás után, a mintákat inkubáltuk Alexa Fluor 488-konjugált szarum anti-kecske másodlagos antitesttel 4 órán át. A sejteket ezután megfestettük DAPI-val 10 percig, mostuk négyszer, HEPES pufferben hagytuk és Zeiss LSM 510 konfokális lézerpáztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. Az mTNF- α eloszlásának szemléltetésére, az áttekinthető képek és a háromdimenziósak 1.5 mm optikai vastagságúak. A CMTMR-festett apoptotikus sejteknek vörös fluoreszcenciája látható, a sejtmagnak kék.

mTNF- α expresszió meghatározása a sejtfelszínen

A BMDM és RAW264.7 sejteket 100 ng/ml bakteriális LPS-sel stimuláltuk jelzett időpontokban, majd előinkubáltuk galardinnal (5 μ g/ml) 4 órán át vagy önmagában. A kezelés után, a makrofágokat lemostuk (1xPBS), összegyűjtöttük, blokkoltuk 50%-os FBS-sel 30 percig, megfestettük FITC-jelölt anti-egér TNF- α vagy FITC jelölt patkány IgG1 izotípus kontroll antitestekkel, és fixáltuk 1%-os paraformaldehiddel. A megfestett sejteket FACSCalibur-on vizsgáltuk. Az eredményeket WinMDI 2.9 szoftverrel értékeltük ki.

Teljes RNS izolálása és kvantitatív RT-qPCR

Totál RNS-t a kontroll és bakteriális LPS-kezelt BMDM és RAW264.7 makrofágokból (3×10^6 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 (1 μ g/minta) cDNS-sé történő átirásához High Capacity cDNA RT Kitet használtunk. TNF- α , TGF- β 1, és IFN- α génexpressziós változásainak detektálása valós idejű kvantitatív PCR technikával történt, melyhez génspecifikus FAM-MGB-jelölt primereket és próbákat tartalmazó oligomixeket (TaqMan Gene Expression Assay) használtunk. A mintákat Roche LightCycler LC480 segítségével triplikátumokban futtattuk. Az adatok kiértékelése SDS 2.1 programmal történt. A génexpressziós szinteket komparatív CT (ddCT) módszerrel határoztuk meg, melyhez normalizáló génként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH)-t használtunk.

Foszforilációs változások a MAPK jelátvitelben mTNF- α fokozását követően

Anti-mTNF- α antitestet vagy izotípus kontrollját lekötöttük 6-lyukú tenyésztőedényre, majd hozzáadtuk a BMDM sejteket (3×10^6 sejt/lyuk) önmagában vagy neutralizáló TGF- β antitest (5 $\mu\text{g/ml}$) jelenlétében. 2 órás inkubáció után meghatároztuk humán foszfo-MAPK array segítségével a MAPK kinázok és más szerin/reonin kinázok foszforilációjának relatív szintjeit. A pixel sűrűséget az array egyes pontjában ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg.

Western blot analízis MKK3/MKK4/MKK6/MKK7 foszforilációs szintjeinek detektálására

A teljes sejt homogenizátumot használtuk. 40 μg fehérjét futattunk 12%-os poliakrilamid gélen, majd átblottoltuk polivinilidén-difluorid membránra Bio-Rad elektrofórezis és transzfer rendszert használva. A membránok szabad kötőhelyeit leblokkoltuk 5%-os nem zsíros száraz tejpörrel 20 mM Tris, 0.1 M NaCl pufferben, 0.1%-os Tween-nel 1 órán át szobahőmérsékleten. A blottokat ezután inkubáltuk éjszakán át MKK3/4/7, p-MKK4/7 és 3/6 elsődleges antitestekkel 1:500 hígításban. Peroxidáz-jelölt anti-nyúl IgG-t (1:10,000) használtunk és β -actin antitestet.

Statisztikai analízis

Minden adat reprezentatív, a bemutatott eredmények legalább három, eltérő napon végzett, független kísérlet adatait mutatják be, melyeknél 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.

4. EREDMÉNYEK

4.1. ADENOZIN A_3 RECEPTOR NEGATÍVAN SZABÁLYOZZA AZ APOPTÓTIKUS SEJTFELVÉTEL GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁSÁT

A makrofágok sejtfelszíni adenosin A_3 receptor szintje csökken az apoptotikus sejtek fagocitózisa során

Előzetes tanulmányok kimutatták, hogy az adenosin A_3R kifejeződik makrofágokon, és hozzájárul a sejtek irányított migrációjához. Kutatócsoportunknak korábban sikerült bizonyítania, hogy az apoptotikus sejtfelvétel a makrofágokban az adenosin kibocsátása mellett megnövekedett $A_{2A}R$ szintet is eredményez, így célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy a folyamat hogyan hat a makrofágok A_3R expressziójára. Eredményeinkből látható, hogy az apoptotikus sejttel történő inkubáció szignifikánsan csökkentette a makrofágok A_3R szintjét. A gátlás génszinten valósul meg, mivel nem csak az A_3R sejtfelszíni expressziója, hanem annak mRNS és teljes fehérje szintjei is lecsökkentek a hosszú távú fagocitózis során. A csökkenés azonban a receptor sejtfelszíni expressziójában korábban kimutatható, mint mRNS és fehérje szinten, jelezve, hogy gyors poszttranszlációs mechanizmusok is részt vehetnek az A_3R gátlásában.

A citokalazin D gátolja a bekebelezés folyamatát, de nem befolyásolja az apoptotikus sejtek felismerését. Az apoptotikus sejtek foszfatidiliszterint kötő receptorokon keresztül történő felismerése fontos szerepet játszik az elhaló sejtek makrofágok általi eltakarításában. Ez a felismerés gátolható az apoptotikus sejtek rekombináns annexin V-tel történő előinkubálásával (amely nagy affinitással kötődik a foszfatidiliszterinhez). Míg a rekombináns annexin V megakadályozta a makrofágok A_3 receptorának gén- és fehérje szintű csökkenését apoptotikus sejtfelvétel során, addig a citokalazin D ilyen szempontból hatástalannak bizonyult, ami arra utal, hogy nem a bekebelezés, hanem már önmagában a felismerés is képes a gátlás előidézésére. Az A_3R szint csökkenése specifikus az apoptotikus sejtek felvételére, élő, nekrotikus, vagy antitesttel burkolt sejtekkel a folyamat nem volt kiváltható.

Adenosin A_3 receptor hiányában megváltozik a makrofágok apoptotikus sejtekre adott gyulladásos citokin termelése

A nyugvó makrofágok citokinprofiljának meghatározása egy igen érzékeny módszer segítségével történt, mely lehetővé teszi több citokin egyidejű kimutatását (alacsony, pikogram/milliliter tartományban). A panelről 40 különböző citokin szintje olvasható le. Kísérleteink során először a vad típusú és $A_3R^{-/-}$ nyugvó makrofágok citokinprofilját hasonlítottuk össze. Eredményeinkből

látható, hogy az A_3 receptor hiánya nem befolyásolja jelentős mértékben a nyugalomban lévő makrofágok citokintermelését. A citokinek szintjének mérésekor ugyan egyedi fajon belüli variációkkal találkoztunk, de a MIP-2 és KC kemokinek ELISA technikával történő meghatározásakor szignifikáns különbségek nem voltak detektálhatóak a vad típusú és A_3 receptor hiányos nyugvó makrofágok citokin profilját tekintve. Apoptótikus sejtet felvett makrofágok esetében viszont négy citokint találtunk, amelyek termelődése megemelkedett a vad típusú fagocitáló makrofágok esetében összehasonlítva a nem fagocitáló társaikkal, de csökkent az A_3R hiányos makrofágokban. Ezek közé a citokinek közé tartozik a főként neutrofilekre ható keratinocita eredetű kemokin (KC) és a makrofág eredetű gyulladásos peptid-2 (MIP-2), illetve a gyulladásos citokin IL-1 α és az IL-1 receptor antagonistája (IL-1ra). Az A_3R hiányos makrofágok által csökkent mennyiségben termelt citokinek közül a MIP-2 mutatta a leginkább dinamikus változást apoptótikus sejtrel történő kezelés után, illetve a MIP-2 és KC szinteket detektáltuk a legnagyobb mennyiségben. Ezek a megfigyelések korrelálnak az $A_{2A}R$ hiányos makrofágok esetében találtakkal, melyekben az $A_{2A}R$ hiánya ugyanezen citokinek termelődését befolyásolta az apoptótikus sejtek fagocitózist követően, de a változás iránya éppen ennek az ellenkezője volt, vagyis ezen citokinek megemelkedett szintjét eredményezte. Annak kizárására, hogy a citokin profilokban talált eltéréseket az A_3R hiányos makrofágok esetleges differenciálódási zavarai okozzák, megismételtük a citokin profilra irányuló kísérleteket A_3R -specifikus agonista (IB-MECA), illetve antagonistája (MRS1523) jelenlétében.

Vad típusú makrofágok esetében az A_3R antagonistája hatására csökkent a gyulladásos citokinek expressziója, ami azt bizonyítja, hogy a fagocitáló A_3R hiányos makrofágok módosult citokin válasza nem a sejtek megváltozott differenciálódásának köszönhető. A_3R agonista jelenlétében továbbá megemelkedett ezen citokinek expressziója jelezve, hogy az A_3R jelátvitel valóban negatívan regulálja az apoptótikus sejt gyulladáscsökkentő hatását ezen citokinekre kivetítve. A_3R hiányos sejtekben ugyanezen vegyületek jelenléte nem okozott számottevő változást a citokin profilban (nem közölt adatok) ami azt mutatja, hogy valóban ezen a receptor útvonalon keresztül hatnak. Megerősítésként a MIP-2 és KC fehérje szintjeit ELISA technikával is meghatároztuk. Összhangban a citokin array eredményeivel, a MIP-2 és KC termelődése a nyugvó sejtekhez képest megemelkedett a vad típusú, apoptótikus sejtet fagocitáló makrofágok esetében, míg ezek szintje csökkenést mutatott az A_3 receptor hiányában azonos körülmények között.

Az A₃ receptor hiányos makrofágok apoptótikus sejtekre adott csökkent MIP-2 és KC választát a protein kináz A jelátviteli útvonal A_{2A} receptorok általi aktiválódása okozza

Mivel azok közül a neutrofil kemoattraktánsok közül, melyek egyaránt változást mutattak A₃R és A_{2A}R hiányában, a MIP-2 és KC szintje módosult leginkább, így a továbbiakban e két citokin expressziójának szabályozását kívántuk tovább vizsgálni. Munkacsoportunk korábban kimutatta, hogy az említett citokinek termelése fokozódhat az apoptótikus sejtek felvétele során, azonban az adenilát-cikláz útvonal egyidejű A_{2A} receptorok általi aktivációja védelmet nyújtott a MIP-2 és KC túltermelése ellen. Mivel a Gi-kapcsolt adenosin A₃R-ról ismert, hogy gátolja az adenilát-cikláz aktivitását, úgy spekuláltunk, hogy ha a fagocitált makrofágok képesek az A₃ receptor aktiválásához elegendő mennyiségű adenosint termelni, akkor A₃R hiányos makrofágokban a jelátvitel hiánya A_{2A}R általi megemelkedett adenilát-cikláz aktivitáshoz vezethet. Ha ez így van, akkor a megemelkedett adenilát-cikláz jelátvitel megmagyarázhatja a KC és MIP-2 termelésének hatékonyabb gátlását A₃R hiányos fagocitált makrofágokban. A szelektív A_{2A}R antagonistá SCH442416, illetve a protein kináz A inhibitor H89 jelenléte; valamint Rp-cAMP trietilamin (cAMP dependens protein kináz I és II cAMP általi aktiválásának egy specifikus membrán-permeabilis inhibitora) adása szignifikánsan megemelte az A₃R hiányos apoptótikus sejtet fagocitáló makrofágok MIP-2 és KC termelését. A másik oldalról az A_{2A}R stimulációt mimikálva forskolin adásával (mely egy adenilát-cikláz aktivátor) sikerült lecsökkentenünk a MIP-2 és KC termelését vad típusú makrofágokban. A forskolin ugyanolyan koncentrációja azonban hatástalan volt az A₃R hiány esetében jelezve, hogy az adenilát-cikláz útvonal teljesen aktiválódott ezekben a sejtekben. Amennyiben Rp-cAMP trietilamin inhibitorral kezeltük az A_{2A}R vagy A₃R hiányos makrofágokat és a vad típusú társaikat, akkor hasonló MIP-2 és KC termelést találtunk az egyes párokban, vagyis az adenilát-cikláz jelátviteli útvonal hiánya képes eltüntetni az apoptótikus sejt által kiváltott MIP-2 és KC termelésbeli különbségeket. Mindezeket túl az apoptótikus sejt-indukálta gyulladásos válaszban szignifikáns törzsön belüli varianciát figyeltünk meg. Jelenleg azonban még nem tudjuk teljes bizonyossággal megállapítani, hogy hogyan indukálják az apoptótikus sejtek az adenosin-kontrollált gyulladásos választ, illetve nem tudjuk azonosítani az egértörzsek közötti molekuláris különbségeket sem. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a vad típusú makrofágokban az adenilát-cikláz útvonal nem teljesen aktiválódott, illetve A_{2A}R és A₃R által ellentétesen szabályzott jelátvitel egyensúlya dönti el a MIP-2 és KC termelésének mértékét az apoptótikus sejtek jelenlétében.

A₃R hiányos makrofágok módosult MIP-2 és KC termelése a megváltozott NO termelés következménye

Munkacsoportunk által folytatott korábbi tanulmányaink kimutatták, hogy a NO termelés fokozása apoptotikus sejteket fagocitált makrofágokban hozzájárul MIP-2 felszabaduláshoz. A NO apoptotikus sejtlevétel során játszott potenciális MIP-2 és KC termelést befolyásoló szerepének tisztázására a makrofágokat nitrogén-monoxid szintáz (NOS) inhibitor L-(G)-nitro-L-arginin metilészter (L-NAME) kezelésnek vetettük alá az apoptotikus sejtkelés előtt. Korábban már megállapítottuk, hogy L-NAME hozzáadása képes gyengíteni az apoptotikus sejt által indukált MIP-2 expresszióját vad típusú makrofágokban, jelen kísérleteinkben pedig azt tapasztaltuk, hogy ezen inhibitornak nem volt hatása a MIP-2 termelésre A₃R hiányos makrofágok esetében. Összhangban ezekkel az eredményekkel megállapítottuk, hogy a vad típusú makrofágok detektálható mennyiségű NO-t termelnek apoptotikus sejt hozzáadása során, míg az A₃R hiányos makrofágok nem. Rp-cAMP jelenlétében azonban az apoptotikus sejtet fagocitáló A₃R hiányos makrofágok képesek voltak hasonló NO mennyiséget termelni mint a vad típusú makrofágok, ami arra utal, hogy a NO termelésük gátolható az adenilát-cikláz jelátviteli útvonal által. Korábbi tanulmányok azt mutatták, hogy egy lehetséges NO donor, a nátrium-nitoprusszid (SNP), hozzáadása önmagában nem indukál MIP-2 termelést, de vad típusú makrofágokban képes szignifikánsan megemelni az apoptotikus sejt-indukált MIP-2 termelést. Érdekes módon, a SNP nem volt hatással a MIP-2 termelésre az A₃R hiányos makrofágokban. Amikor azonban a SNP-t és az Rp-cAMP-t együtt alkalmaztuk, megemelkedett MIP-2 termelést tapasztaltunk A₃R hiányos makrofágoknál. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy A₃R hiányában makrofágokban a megemelkedett adenilát-cikláz jelátvitelnek nemcsak a NO termelést, hanem egyidejűleg más olyan jelátviteli elemeket is gátolnia kell, melyek hozzájárulnak az apoptotikus sejt által indukált MIP-2 termeléshez.

4.2. A TRANZMEMBRÁN TNF- α REVERZ JELÁTVITEL GÁTOLJA A LIPOPOLISZACHARID-INDUKÁLT GYULLADÁSI CITOKIN KÉPZŐDÉST TGF- β INDUKÁLÁS ÁLTAL MAKROFÁGOKBAN

Egér BMDM vagy RAW264.7 makrofágok LPS-sel való stimulálása megemeli az mTNF- α sejtfelszíni expresszióját

Először konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, vajon a TNF- α kimutatható-e nem-stimulált BMDM vagy RAW264.7 makrofágokban. A TNF- α kimutatható mind BMDM és RAW264.7 makrofágokban az intracelluláris vezikulumokban. Bár a fehérje könnyen látható, de minimális mennyiségű TNF- α mRNS-t detektáltunk nem-stimulált sejtekben.

Ha azonban, a makrofágokat 100 ng/ml LPS-sel kezeltük, szignifikáns növekedést detektáltunk a TNF- α mRNS szintjében mindkét sejttípusban, maximumát 2 óras stimulálást követően érte el. Ezután az mRNS szintek fokozatosan csökkentek. A fent említett megfigyelések szerint, mind a BMDM és RAW264.7 makrofágok mTNF- α sejtfelszíni szintje, mely nem detektálható a nem-stimulált sejtekben, emelkedni kezdett LPS stimuláció hatására és ez az expresszió tovább emelkedett galardin jelenlétében, ami egy szintetikus metalloproteináz inhibitor (az mTNF- α sejtfelszíni hasítását gátolja).

A galardin kezelést RAW264.7 sejtekben teszteltük, önmagában is megemelte az mTNF- α sejtfelszíni expresszióját, jelezve, hogy 1) a metalloproteáz felelős az mTNF- α hasításáért, a nem-stimulált sejtekben is ki kell fejeződjön és 2) bár nem tudtuk detektálni az mTNF- α jelenlétét galardin nélkül, valamilyen alapszintű mTNF- α termelésnek lennie kell a nem-stimulált sejtekben. LPS kezelt BMDM és RAW264.7 sejtek mTNF- α sejtfelszíni expressziója 1 óránál érte el maximumát, és aztán elkezdett fokozatosan csökkenni. A galardin-kezelt RAW264.7 sejtekben, az emelkedés a sejtfelszíni mTNF- α expresszióban 15 perc LPS stimulálást követően detektálható volt, jelezve, hogy az mTNF- α már az elején az intracelluláris TNF- α poolból származik. Az LPS-indukált mTNF- α expresszió éles csökkenése 1 óras stimulációt követően, ellentétben a TNF- α mRNS expresszió növekedésével jelzi, hogy a metalloproteáz expressziója, mely felelős az mTNF- α hasításáért, indukálódott LPS stimuláció hatására makrofágok mindkét típusában. A galardin kezelés jelentősen késleltette a csökkenést a makrofágok mTNF- α expressziójában és szintén késleltette és csökkentette a szolúbilis TNF- α megjelenését a sejt kultúra felülúszójában.

A mTNF- α jelátvitel aktiválja az MKK3/6, Jun kináz és PI3 kináz szabályozott útvonalakat

Mivel az előzetes adatok azt mutatták, hogy az mTNF- α -nak jelen kell lennie a nem-stimulált makrofágok felszínén is, úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk az mTNF- α jelátvitelt BMDM sejtekben foszfo-MAP kináz array kit segítségével, amely lehetővé teszi MAP kinázok és számos kapcsolódó fehérjék foszforilációjának relatív szintjeinek párhuzamos meghatározását. A kapott adatokat a kötött anti-mTNF- α antitestek jelenlétében összehasonlítottuk az izotípus kontroll antitestekével. A mTNF- α stimulálása a kötött anti-mTNF- α antitestekkel MKK3/6-szabályozott MAP kináz, JNK, ERK kináz és PI3 kináz útvonalak aktivációjához vezetett. Mivel az előzetes kísérletekben, melyeket arra használtunk, hogy a mTNF- α jelátvitel aktivációját detektáljuk, kimutattuk, hogy a szolúbilis anti-TNF- α antitestek nem képesek gátolni az LPS-indukált IL-6 és MIP-2 termelést, ezért kötött antitesteket alkalmaztunk a mTNF- α jelátvitel fokozásáért.

MKK3/6, Jun kináz, ERK kináz és PI3 kináz útvonalak aktiválódnak TGF- β indukált mTNF- α jelátviteli útvonalon keresztül

Mivel ezek a változások a különböző fehérjék foszforilációs állapotában 2 óra után detektálhatóak, miután a makrofágok a kötött antitestekre ráültek, nem tudtuk kizárni annak lehetőségét, hogy a mTNF- α jelátvitel fokozza egy másik citokin expresszióját, amely a fent említett három jelátviteli útvonalat hajtja. Mivel a TNF- α , IFN- α , és TGF- β -ről korábban kimutatták, hogy aktiválják a MKK3/6, Jun kináz, és PI3K útvonalakat, úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk, vajon-e citokinek expressziója indukálódik-e mTNF- α fokozására. Bár nem tudtuk kimutatni IFN- α vagy TNF- α indukcióját mRNS szinten, a TGF- β indukció könnyen detektálható volt pan anti-TGF- β antitesttel fehérje szinten és a TGF- β 1 mRNS szinten. Annak meghatározására, vajon a TGF- β valóban felelős a mTNF- α indukált MKK3/6, JNK, ERK kináz és PI3K útvonal aktivációjáért, a kísérleteket megismételtük neutralizáló anti-TGF- β antitestek jelenlétében is. Azon fehérjék mTNF- α -indukált foszforilációját, amelyekről ismert, hogy aktiválódnak TGF- β jelátviteli útvonal által, teljesen vagy részben megakadályozta a neutralizáló TGF- β antitestek adása. Valóban ezek az adatok megerősítik, hogy a mTNF- α jelátvitel-indukált TGF- β felelős a foszforilációjukért.

mTNF- α jelátvitel az MKK4 jelátviteli útvonalat indukálja

Ugyanazokat a blottokat elemeztük a továbbiakban azért, hogy meghatározzuk azokat a kinázokat, melyek közvetlenül tartoznak az mTNF- α jelátvitelhez. Azokat a kinázokat választottuk ki, melyek a mTNF- α jelátviteli útvonalhoz tartoznak, aktivációjukat nem vagy csak részben befolyásolta a neutralizáló TGF- β antitestek adása. PI3K (TOR, Akt 1,2 és 3), p38 α / β , MAPK és JNK útvonalak elemeit találtuk, melyek közvetlenül aktiválódnak az mTNF- α által. A MAPK útvonalak evolúciósan konzerváltak és ez azt mutatja, hogy p38 α / β útvonalak aktiválódhatnak akár MKK3/6 vagy MKK4/MKK7 által. Mivel MKK3 és MKK6 nem aktiválódott az mTNF- α jelátviteli útvonal által, de az MKK4 és MKK7 is aktiválhatja a Jun kinázokat, úgy döntöttünk, hogy meghatározzuk a foszforilációs szintjeiket mTNF- α fokozását követően.

A TGF- β jelátvitellel való interferencia elkerülése érdekében a kísérleteket neutralizáló TGF- β antitest jelenlétében végeztük. MKK4 foszforilációja átmenetileg növekedett, míg MKK7-é nem volt kimutatható mTNF- α jelátvitel alatt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az MKK4 közvetíti az mTNF- α hatását. Neutralizáló TGF- β antitest hiányában, az MKK4 indukált foszforilációs szintje még 2 órán át is magas maradt, összhangban azzal a ténnyel, hogy TGF- β is kiváltja az MKK4 aktivációját. Az MKK3/6 foszforilációja TGF- β által indukált, késéssel megjelent, összehasonlítva

az MKK4-el, az MKK3 szintek nem változtak. Az MKK7 fehérje szintje fokozatosan csökkent, jelezve, hogy a TGF- β gátolja az MKK7 jelátvitelt.

Ezután úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk melyik mTNF- α aktivált jelátviteli útvonal járul hozzá a TGF- β indukciójához. Mindkét mitogén és stressz-aktivált kináz 2 és riboszómális S6 kináz 2 foszforilációs szintjéről ismert, hogy p38 MAP kinázok által aktiválódnak, és mTNF- α jelátvitel által indukáltak. Ezek a kinázok foszforilálhatnak CREB-et Szerin 133-on és aktiválhatnak CREB-függő génexpressziót. Mivel mindkét TGF- β 2 és - β 3 promoter tartalmaz cAMP válaszadó elemet, úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk vajon a p38 MAPK-ok szelektív gátlása SB203580-al (10 μ M) befolyásolhatja-e az mTNF- α indukált TGF- β termelést. p38 MAPK gátlása csökkentette a mTNF- α indukált TGF- β termelést. A TGF- β 1 promoterről, másodlagosan azt mutatták ki, hogy elsősorban AP-1 oldalon szabályozódik. Ezzel a megfigyeléssel összhangban, Jun kinázok gátlása TCS JNK 60-al is csökkentette az mTNF- α indukált TGF- β termelést és teljesen gátolta mTNF- α indukált TGF- β 1 mRNS képződését. p38 α/β kinázok gátlása SB203580-al, másodlagosan nem volt hatással a TGF- β 1 mRNS termelésre. Azonban, ha a p38 kináz α/β inhibitorot adtuk együtt Jun kináz inhibitorral, akkor az mTNF- α indukált TGF- β termelés teljes mértékben gátolható volt.

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a Jun kináz útvonal elsősorban TGF- β 1-t szabályozza, míg a p38 kináz α/β útvonal más TGF- β -k termelését szabályozza. Éles ellentétben, a PI3K (amelyről ismert, hogy aktiválja Akt útvonalat) gátlása wortmanninnal (PI3K inhibitor) megnövekedett TGF- β képződést eredményezett. Ez a megfigyelés azt jelzi, hogy ez az útvonal egy negatív önszabályozó folyamatot eredményez a TGF- β termelés szabályozásában. Akt aktiváció mechanizmusát nem vizsgáltuk tanulmányainkban, de más tanulmányokban azt találták, hogy az MKK4 útvonal gátolhatja PIP3 (foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát) 3-foszfátáz szintjeit, mely Akt aktivációjához vezet.

A mTNF- α jelátvitel gátolja az LPS-indukált gyulladásos citokinek termelését

Mivel az előzetes kísérletek azt mutatták, hogy a mTNF- α jelátvitel gátolja az LPS-indukált IL-6 és MIP-2 képződését különböző mértékben, úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk a mTNF- α jelátvitel hatását az LPS-indukált gyulladásos citokin képződésre, egyszerre több gyulladásos citokin termelés kimutatására használt citokin array segítségével. BMDM sejtek NMRI állatokból származtak, melyeknél általában TIMP-1, M-CSF és JE gyulladásos citokinek jelentek meg alap szinten. LPS adása nem befolyásolta e citokinek termelését. Bár mindig hasonló mennyiségű LPS-sel kezeltük a sejteket, LPS-re adott válaszuk izolálástól izolálásig változott. A BMDM sejtek 2 órás adása a kötött anti-mTNF- α -hoz mindig gyengített LPS-indukált gyulladásos citokin képződést mutatott, de a hatás

drámaibb volt, amikor a sejtek alacsonyabb LPS választ mutattak. Azonban, nem mindegyik citokin mutatott hasonló érzékenységet mTNF- α gátlásra. LPS indukált G-CSF, I-309, IL-10, IL-16, IL-23, IL-1 α , és IL-1 β termelés gátlása majdnem teljesen, IL-6, IP-10, MIP-1 β , IL-1ra, M-CSF, és RANTES termelés szignifikánsan gátolt, de MIP-1 α , MIP-2, TIMP-1, JE, vagy KC termelések is csökkentek. Annak bizonyítására, hogy a kötött anti-mTNF- α antitestek valóban mTNF- α -n keresztül hatnak, TNF- α hiányos makrofágokhoz LPS-t adtunk és néztük vajon az anti-mTNF- α antitestek befolyásolják-e citokin termelésüket. A kötött anti-mTNF- α antitestek szignifikánsan nem változtatták meg a TNF- α hiányos egerekből izolált makrofágok LPS-indukálta gyulladásos citokin termelését.

A mTNF- α jelátvitel gátolja az LPS-indukált gyulladásos citokin képződést TGF- β fokozás által

Ezután úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk vajon a TGF- β vesz-e részt az LPS-indukált gyulladásos citokin képződés gátlásában mTNF- α által, neutralizáló anti-TGF- β antitestek alkalmazásával. Neutralizáló anti-TGF- β antitestek nem befolyásolták az LPS-indukált gyulladásos citokin termelést izotípus kontroll antitestek jelenlétében, kivéve IL-23, IL-1 α , és IL-1 β esetében. Azonban erősen beleszólnak az LPS-indukált gyulladásos citokin képződés mTNF- α -közvetített gátlásába, kivéve a három citokint, amelyeket a neutralizáló anti-TGF- β antitestek befolyásoltak az izotípus kontroll antitest-kezelt mintákban szintén. A mTNF- α jelátvitel gátló hatásának összefoglalását az LPS-indukált IL-6 és MIP-2 termelésre ELISA-val mutattuk ki és a neutralizáló TGF- β antitestek hatása 10 független kísérletből származtak. Továbbá, 2 órás rekombináns TGF- β előinkubálással is gyengítettük az LPS-indukált gyulladásos citokin képződést BMDM sejtekben citokin-specifikus módon.

Az apoptotikus timociták nem használják a mTNF- α jelátviteli útvonalat arra, hogy downregulálják a makrofágok LPS-indukálta gyulladásos választ

Mivel a különféle patogének - különösen baktériumok és vírussal fertőzött sejtek - fagocitózisa általában gyulladásos választ idéz elő a makrofágokban, addig az apoptotikus sejtek felvétele általában gyulladásoscsökkentő fenotípust indukál. Ez nem egyszerűen azért történik, mert az apoptotikus sejtek nem nyújtanak gyulladásos válaszokat, sokkal inkább aktívan beleszólnak a gyulladásos programba. Például, makrofágok előinkubálása apoptotikus sejtekkel erősen gátolja az LPS indukálta gyulladásos választ és a mechanizmus magában foglalja a TGF- β felszabadulását. Mivel a legtöbb emlős sejt termel TNFR-okat és a timociták egyaránt kifejeznek TNFR I és II-t, úgy döntöttünk, hogy kutatjuk TNF- α hiányos makrofágok segítségével, vajon az mTNF- α hozzájárulhat-e az apoptotikus sejtek immunrendszer csendesítő hatásaihoz. A TNF- α hiánya nem

befolyásolta a makrofágok alap gyulladásai citokin képződését és azok downregulációját, ha apoptotikus sejteket fagocitáltak. Apoptotikus sejtek adása makrofágokhoz számos LPS-indukált gyulladásai citokin válaszában downregulációját eredményezte TGF- β -függő módon, de mTNF- α hiányát teszteltük TNF- α hiányos makrofágokon, nem befolyásolta az apoptotikus sejtek válaszában képességét.

Továbbá, nem tapasztaltunk összefüggést az LPS kezelt makrofágok TNF- α tartalmú vezikulumainak elhelyezkedése és a fagocita portálok helyzete között apoptotikus sejtekre. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a mTNF- α jelátvitel nem játszik szerepet az apoptotikus sejt-indukált gyulladáscsökkentő válaszában. Így ellenőriztük, vajon az apoptotikus timociták termelnek-e még TNFR-okat. A timociták egyaránt kifejeznek TNFR I és II-t, de ahogy belépnek az apoptózisba szérumból megvonását követően, mindkét TNFR expresszióját gátolják. A gátlás nem volt apoptotikus jel specifikus, ha a timocitákhoz dexametazont vagy forbol dibutírat/ionomicint is adtunk, TNFR-aik teljes gátlásával válaszoltak 5 órán belül. Érdekes módon, az apoptotikus neutrofilekről ismert, hogy ha találkoznak LPS-aktivált makrofágokkal gyulladásos helyzetben, gátolják TNFR-aikat apoptózis során. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az apoptotikus sejtek nem tudnak mTNF- α választ fokozni az immunrendszer csendesítésére.

TNF- α -gátló molekulák szelektíven TGF- β termelést idéznek elő humán makrofágokban

A TNF- α gátló molekulákat széles körben használják különböző gyulladásos betegségek terápiájában, mint rheumatoid arthritis, psoriasisához társuló arthritis, fiatalkori arthritis, Crohn-colitis, spondylitis ankylopoetica, és pikkelysömör. Az etanercept egy rekombináns humán szolubilis TNFR2 IgG Fc részéhez kapcsolt fúziós fehérje, infliximab egy kiméra monoklonális antitest egész variábilis régiókkal és humán Ig G1 állandó régiókkal, és a golimumab egy humán anti-TNF- α IgG1k monoklonális antitest, amely beadható a betegnek. Bár az összes vegyület semlegesíti a TNF- α -t ugyanolyan hatékonysággal és hasonlóan hatásosak a rheumatoid arthritis kezelésében, a golimumab és az infliximab hatásosak, míg az etanercept sikertelen a Crohn-betegségben, Wegener granulomatosis-ban, és sarcoidosis-ban. Így úgy döntöttünk, hogy megvizsgáljuk, vajon ezek a vegyületek előidézhetnek-e TGF- β termelést humán makrofágokban. A humán makrofágok buffy coat-ból származnak, három külön kísérletben vagy etanerceptet, infliximabot vagy golimumabot adtunk a sejtekhez, mindegyiket 50 μ g/ml koncentrációban 4 órán át, és aztán meghatároztuk a TGF- β szintet a sejtfehérülészóban. A kezeletlen makrofágok esetében 39 ± 5 pg/ml TGF- β -t tudtunk mérni. Etanercept hozzáadása (TGF- β , 40 ± 4 pg/ml) nem befolyásolta a TGF- β alap szintjét, míg az infliximab (78 ± 15 pg/ml) és a golimumab kultúrákban (96 ± 12 pg/ml) TGF- β -t tudtunk kimutatni, ezek szintjei szignifikánsan magasabbak voltak ($p < 0.05$), mint az alapszintek.

5. MEGBESZÉLÉS

A makrofágok, mint az immunrendszer elsődleges őrszemai, kritikus szerepet játszanak a potenciálisan veszélyes “nem saját” (pl. patogének) és “megváltozott/sérült saját” (elhaló és tumor sejtek) sejtek felismerésében, valamint a megfelelő, azonnali és hatékony immunválasz megindításában ezen struktúrák ellen. Ezek a makrofág funkciók, lényegesek az immunhomeosztázis fenntartásában és zavaruk autoimmun és krónikus gyulladásos betegségek kialakulásához vezethet.

Az úgynevezett PAMP-ok (patogén-asszociált molekuláris mintázatok, mint a Gram-negatív bakteriális sejtfall komponens LPS) és DAMP-ok (veszélyhez-asszociált molekuláris mintázatok, mint a HMGB1 felszabadulása nekrotikus sejtek által) felismerése eltolja a makrofágokat M1 gyulladásos fenotípus irányába. M1 makrofágok nem csak gyulladásos mediátorokat termelnek (pl. prosztaglandinok, leukotriének, IL-6, TNF- α , iNOS) hanem fagocitózishoz és antigénbemutathoz kapcsolódó sejtfelszíni molekulákat, növekedési faktorokat és kemoattraktánsokat is (pl. MIP-2, MIP-1). E mechanizmusok által a makrofágok részt vesznek a potenciálisan káros sejtek eltávolításában és az immunrendszer más sejtjeitípusainak aktivációjában/toborzásában.

Továbbá, a makrofágok a folyamatosan keletkező és jelenlevő elhaló apoptotikus sejteknek vannak kitéve. A PAMP-ok és DAMP-okkal szemben, a ACAMP-ok (apoptotikus-sejt-asszociált molekuláris mintázatok, pl. sejtfelszíni foszfátidilszerin) felismerése nem tudja kiváltani az M1 fenotípushoz kapcsoló és gyulladásos válaszokat a makrofágokban. Sőt, az ACAMP-ok aktív gyulladásoscsökkentő jeleket képviselnek a makrofágok számára. Ez a jelenség elengedhetetlen az immuntoleranciához az ártalmatlan apoptotikus sejtek ellen.

A jelen tanulmányban, egyrészt megvizsgáltuk vajon az A₃R részt vehet-e az apoptotikus sejtekkel indukált makrofágok gyulladásoscsökkentő válaszában szabályozásában. Azt találtuk, hogy az A_{2A}R-okkal ellentétben, a bekebelező makrofágok downregulálják az A₃R-okat fagocitózis során. Mivel az A_{2A}R-ok fokozása részt vesz a nukleáris lipid érzékelő receptorok aktivációjában fagocitózist követően, A₃R-ok expressziója úgy tűnik, hogy gátolt a sejtfelszíni makrofág receptorokat felismerő foszfátidilszerinen keresztül apoptotikus sejtek felszínén.

A_{2A}R-okhoz hasonlóan, az adozin A₃R-ok hiánya nem befolyásolta a fagocitózis mértékét. Azonban, ha apoptotikus sejtekkel kezeljük, az A₃R hiányos makrofágok csökkent mennyiségű MIP-2-t és KC-t termeltek, melyek kemoattraktánsok különféle sejtjeitípusokra, különösen neutrofilekre hatók. Ezeket az adatokat meg tudtuk erősíteni specifikus A₃R antagonistá használatával, jelezve, hogy a tényleges A₃R jelátvitel hiánya inkább megváltozott makrofág

differentiációt okoz A_3R hiányában. Érdekes módon, a citokinek - nevezetesen neutrofil kemoattraktánsok - hasonló termelését befolyásolta az A_3R hiánya úgy mint $A_{2A}R$ hiánya, de ellenkező irányban, jelezve, hogy A_3R jelátvitel a vad típusú makrofágokban gátolhatja $A_{2A}R$ jelátvitelt.

A bemutatott adatok azt jelzik, hogy A_3R hiányos makrofágokban az A_3R hiánya, ami általában negatívan szabályozza az adenilát-cikláz aktivitást fagocitózis során, megemelkedett adenilát-cikláz jelátvitelt eredményez $A_{2A}R$ által, az apoptotikus sejt-indukált NO termelés teljes gátlásához és az ebből következő neutrofil kemoattraktáns képződéshez vezet. Ennek eredményeként, sem a forskolin hozzáadása, ami tovább aktiválhatja az adenilát-cikláz, sem a NO szintézis gátlása, mivel nem volt kimutatható NO termelés, nem volt hatással A_3R hiányos apoptotikus sejteket fagocitált makrofágok össz MIP-2 termelésére.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az apoptotikus sejtek felvételét PGE2 felszabadulás kíséri, amely EP2-4 receptorokon keresztül képes aktiválni az adenilát-cikláz is. Azonban, ha gátoltuk az adenilát-cikláz jelátvitelt Rp-cAMPS trietil-aminnal, nem találtuk különbséget az apoptotikus sejt-indukált neutrofil kemoattraktáns képződésben A_3R vagy $A_{2A}R$ hiányos makrofágok és vad típusú társaik között jelezve, hogy a fő receptor, mely az adenilát-cikláz aktivitást kiváltja és a neutrofil kemoattraktáns képződést gátolja A_3R jelátvitel hiányában, $A_{2A}R$ -nak kell lennie. Ez a megfigyelés alátámasztja továbbá azt a megállapítást, hogy $A_{2A}R$ jelátvitel gátlása az A_3R hiányos fagocitált sejtekben hasonló gyulladásos citokin képződést eredményez, mint az adenilát-cikláz útvonal gátlása Rp-cAMPS által. Adataink azt is jelzik, hogy a fő receptor mely gátolja az adenilát-cikláz útvonalat A_3R .

Korábban már kimutattuk, hogy a külsőleg adott NO önmagában nem elegendő ahhoz, hogy kiváltsa a neutrofil kemoattraktáns képződést makrofágokban, de megemeli azt, ha fagocitált vad típusú makrofágokhoz adjuk hozzá. Ez a megfigyelés azt mutatta, hogy az apoptotikus sejtek fokozzák a neutrofil kemoattraktáns képződést nem csak indukáló NO képződésen, hanem egyidejűleg további jelátviteli útvonalak fokozásán keresztül is. Mivel A_3R hiányos fagocitált makrofágokban, melyekben az adenilát-cikláz jelátviteli útvonal erősen aktivált, exogén NO megemelheti a neutrofil kemoattraktáns képződést csak akkor ha együtt adunk hozzá Rp-cAMPS trietil-amint, adataink azt mutatják, hogy a megemelt adenilát-cikláz jelátvitelnek kell beleszólnia a további útvonalakba is.

Adataink azt mutatják, hogy a vad típusú apoptotikus sejteket fagocitált makrofágokban kezdetben mind az $A_{2A}R$ és A_3R -ok aktiválódnak adénózinnal, és a két receptor aktivációi közötti egyensúly dönti el az adenilát-cikláz jelátvitel erejét és az apoptotikus sejt-indukált kemoattraktáns képződés gátlásának mértékét. De mivel az $A_{2A}R$ -ok fokozódnak, miközben A_3R -ok eltűnnek a fagocitált

makrofágok sejtfelszínéről, addig az adenosin hosszú távon közvetíti a gyulladás gátlását, ha a makrofágok apoptotikus sejteket fagocitálnak.

Az adenosin A_3 receptor szerepének tanulmányozása mellett az apoptotikus sejt-közvetített immunreakció csendesítésben, vizsgáltuk az mTNF- α jelátvitel lehetséges szerepét apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok LPS-indukált gyulladásai válaszáinak gátlásában. Azt találtuk, hogy bár alacsony szinten TNF- α expresszálódik a nem-stimulált makrofágokban, és néhány megjelenik a sejtfelszínen, mint mTNF- α . LPS adása megemelte mind a TNF- α szintézist és annak sejtfelszíni expresszióját, de ez az emelkedés csak átmeneti volt a metalloproteáz aktiváció miatt, mely felelős annak hasításáért. Már az mTNF- α alap sejtfelszíni szintje elegendő egy hatékony mTNF- α jelátvitelre és azt találtuk, hogy ez a jelátviteli út vonal TGF- β termeléséhez vezet. A TGF- β termelés kiváltása azonban, nem egy univerzális válasza a sejteknek mTNF- α jelátvitelre, mert monocitákról ismert, hogy TNF- α -t termelnek és nem TGF- β -t, amikor mTNF- α -juk fokozódott aktivált T sejtek TNF-Receptorai által.

Azt a jelátviteli út vonalat is azonosítottuk, ami szabályozza a mTNF- α -indukált TGF- β termelődést makrofágokban. Ez az út vonal részt vesz az MKK4-iniciált MAPK út vonalban, ami mind a p38 MAPK-ok és JNK-ok aktivációjához vezet. Míg a Jun kináz út vonal szabályozza a TGF- β 1 termelését, addig a p38 MAPK-ok felelősek a többi TGF- β termeléséért. Ezzel szemben, az Akt út vonal is aktiválódik mTNF- α által, úgy tűnik, mint egy negatív önszabályozó folyamat a mTNF- α -indukált TGF- β termelés kontrolljában. Bár a korábbi tanulmányok azt sugallták, hogy a mTNF- α fokozza az ERK kináz út vonalat, adataink azt mutatják, hogy e kinázok aktivációja csak másodlagos és a TGF- β jelátvitel következménye. Azt is kimutattuk, hogy a mTNF- α jelátvitel önmagában csak egy átmeneti MKK4 és p38 MAPK aktivációt indukál, ha a TGF- β -t semlegesítjük; azonban a TGF- β megjelenése fenntartja az MKK4 és az ebből következő p38 MAPK jelátvitelt.

Megerősítettük, hogy a mTNF- α jelátvitel valóban gátolja az LPS-indukált gyulladásai citokin képződést, de azt találtuk, hogy a különböző citokinek különböző érzékenységet mutatnak erre a gátlásra. Azt is kimutattuk, hogy a mTNF- α jelátvitel beleszól az LPS jelátvitelbe TGF- β autokrin termelésén keresztül. Mivel a korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az LPS-indukált jelátviteli út vonal különböző elemei részt vesznek egyes citokinek indukálásában, adataink azt mutatják, hogy a TGF- β jelátvitel szelektíven beleszólhat a különféle LPS-indukált jelátviteli út vonalakba. Az adataink alátámasztják a korábbi megállapításainkat, amelyben kimutattuk, hogy TGF- β jelenlétében az LPS-indukált ERK és p38 MAPK aktivitások közötti egyensúly rosszul szabályozott az egyidejű TGF- β -stimulált ERK aktivációnak köszönhetően. Ennek eredményeként, az NF- κ B-vezérelt transzkripcióról kimutatták, hogy gyengített, míg az AP-1-vezérelt transzkripció fokozott.

Azt is vizsgáltuk, vajon három TNF- α -gátló molekula, melyeket különböző gyulladásos betegségek terápiájában már bevezettek, kiválthatja-e az mTNF- α -vezérelt TGF- β termelést humán makrofágokban. Azt találtuk, hogy az etanercept nem képes kiváltani egy ilyen mTNF- α -vezérelt TGF- β termelést, míg az infliximab és golimumab képesek erre, jelezve hogy az infliximab és golimumab fokozza az mTNF- α jelátvitelt. Megfigyelésünk alátámasztására, az infliximab a betegeknél kimutatták, hogy indukálja a p38 MAPK-ok és Hsp70 – az mTNF- α jelátviteli útvonal elemei - átmeneti foszforilációját. Korábbi vizsgálatok azt vetették fel, hogy a TNF- α -gátló molekulák terápiás hatékonysága nem csak a neutralizáló TNF- α képességükkel lehet kapcsolatban, hanem befolyásolhatják biológiai természetüket vagy fokozhatják az mTNF- α jelátvitelt. Valóban, bár mindhárom vegyület semlegesíti a TNF- α -t ugyanolyan hatékonysággal és hasonlóan hatásosak a reumatoid arthritis kezelésében, azonban az etanerceptnek vizsgálatunkban nem sikerült kiváltania a TGF- β -t, és három betegségben, Crohn-betegség, Wegener granulomatosis és sarcoidosis vizsgálatokban sem volt hatásos. Mivel más biológiai vizsgálatokban az etanercept hasonlóan reagált az infliximabhoz és golimumabhoz, az adataink azt mutatják, hogy a hiba a fent említett betegségek kezelésében a TGF- β indukció hiányával lehet kapcsolatban. Érdekes módon, a Crohn-betegség, a Wegener granulomatosis és a sarcoidosis mind a megváltozott TGF- β jelátvitel által jellemzett.

Minden nap sejtek billiói halnak el apoptózissal, ez elengedhetetlen a normális szöveti homeosztázis fenntartásához. Az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő hatásai az elhaló sejtek csendes eltakarítását eredményezik valamint jelentősen hozzájárulnak a gyulladás megszűnéséhez. Megvizsgáltuk, vajon az apoptotikus sejtek, melyekről ismert, hogy gátolják a makrofágok LPS jelátvitelét, TGF- β fokozása által használják-e az mTNF- α jelátvitelt ezen a módon. Adataink azt mutatják, hogy az apoptotikus sejtek nem váltanak ki mTNF- α jelátviteli útvonalat makrofágokban, mert gátolják TNF receptorait.

Adataink együttesen azt mutatják, hogy a TGF- β indukciója, ami egy erős gyulladáscsökkentő citokin, fontos tényező lehet a TNF- α -gátló molekulák terápiás hatékonyságának meghatározásában krónikus gyulladásos betegségekben, mint a Crohn-betegségben. Mivel a Crohn-betegségben szenvedő betegek, akik nem reagálnak infliximab terápiára, mind az ATF-2 és Hsp70 foszforilációja károsodott, akkor nagyon valószínű, hogy ezekben a betegekben a mTNF- α jelátviteli útvonal gátolt.

Új eredményként elmondhatjuk, hogy az adenosin A_3 receptor az adenosin A_{2A} receptorral ellentétesen hatva fokozza az apoptotikus sejtfelevétel során a MIP-2 és KC kemoattraktánsok termelését, de fagocitózis során az expressziója eltűnik. Az mTNF- α nem vesz részt az apoptotikus sejt által közvetített gyulladás ellenes hatásban, mert az apoptotikus sejtek down-regulálják a TNF

receptoraikat. Az mTNF- α út aktiválása makrofágokban TGF- β termelődéséhez vezet. Egyes a terápiában használt TNF- α ellenes vegyületek képesek az mTNF- α út aktiválására, ami hozzájárulhat ahhoz, hogy több krónikus gyulladásos betegség kezelésében is hatékonyak.

Mindent összevetve, a jelen tanulmány az adenozin/A₃R és mTNF- α jelátvitel szerepét vizsgálta a makrofágok gyulladásos válaszainak szabályozásában. Eredményeink nem csak javítják ismereteinket a makrofág-asszociált immunfunkciókról, hanem potenciális terápiás célpontokat szolgálhatnak a „személyreszabott gyógyászatban” különböző autoimmun és krónikus gyulladásos betegségek kezelésében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A makrofágok szervezet védelmét biztosító három fő feladata a következő: a kórokozók és a károsodott, vagy elhalt sejtek bekebelezése és eliminálása; antigén prezentáció és immunmoduláció különböző citokinek és növekedési faktorok felszabadulásán keresztül. Az, hogy milyen mediátorok szabadulnak fel, nagyban függ a makrofágok által felismert sejt típusától, és ez meghatározza a környező szövet és immunrendszer válaszait is.

Ismert, hogy az apoptotikus sejtfelevétel erős gyulladáscsökkentő választ vált ki makrofágokban. Korábban azt gondolták, hogy TGF- β az apoptotikus sejtfelevétel során a legfontosabb, sőt az egyetlen gyulladáscsökkentő citokin, mely közvetíti ezt a gátló hatást. Az elmúlt évek eredményei azonban cáfolják a TGF- β kizárólagos szerepét. Munkacsoportunk megállapította, hogy az apoptotikus sejteknek kitett makrofágok adenzint is termelnek, amely gátolja az apoptotikus sejt által indukált gyulladás választ citokin függő módon a makrofág adenzin A_{2A} receptorok aktiválásán keresztül. Jelen vizsgálatunkban kimutattuk, hogy apoptotikus sejtfelevétel során az adenzin A₃ receptorok expressziója csökken a makrofágok sejt felszínén. E receptor gyulladásos viselkedését megerősíti az a tény is, hogy hiánya neutrofil kemoattraktáns MIP-2 és KC csökkent termeléséhez vezet apoptotikus sejtek bekebelezése során. Az A₃R hiányos makrofágok csökkent MIP-2 és KC termelése egy gyengített apoptotikus sejt által indukált NO termelés következménye, amely fordítottan szabályozódik adenzin A_{2/3} receptor/adenzilát-cikláz/protein kináz A jelátviteli út vonal által.

Ez nem egyszerűen azért történik, mert az apoptotikus sejtek nem nyújtanak gyulladás szignálokat, sokkal inkább aktívan beleszólnak a gyulladás programba. Erre jó példa, hogy a makrofágok apoptotikus sejtekkel történő előinkubálása képes lenyomni az LPS (lipopoliszacharid; a Gram-negatív baktériumok sejt falának egy komponense) által Toll-like receptor 4-en keresztül indukált gyulladás választ. Az mTNF- α -ról korábban kimutatták, hogy ligandként kötődik a TNF- α receptorokhoz, valamint receptorként is működik, amely reverz jelátvitelre képes az mTNF- α -expresszáló sejtekben. Mivel a fordított mTNF- α jelátvitel, hasonlóan az apoptotikus sejtekhez, képes gátolni az LPS-indukált gyulladás citokin kifejeződést, ezért teszteltük a mTNF- α lehetséges szerepét az apoptotikus sejt-indukált immunsuppresszióban. Azt találtuk, hogy a még nem aktivált makrofágok alapszintű mTNF- α -t termelnek. Az mTNF- α fokozása egy MKK4-függő jelátviteli út vonalat indukál, amely TGF- β termeléshez vezet. A TGF- β 1 termelése Jun kinázokon keresztül, míg más TGF- β -k termelése p38 MAP kinázokon keresztül szabályzott. LPS hatására tovább indukálódott az mTNF- α expressziója, valamint az mTNF- α fokozása erősen gátolta az LPS-indukált gyulladás választ TGF- β -függő módon. Az apoptotikus sejtek azonban az immunrendszer

csendesítéséhez nem ezt a jelátviteli útvonalat használják, mert down-regulálják a TNF receptoraikat.

A legfontosabb következtetéseink, hogy az apoptotikus sejtek fagocitózisa során a makrofágokban beinduló gyulladás gátló folyamatokban a TGF- β mellett az adenozinnak és receptorainak van szerepe, míg az mTNF- α -nak nincs. Ezzel szemben az LPS-sel indukált makrofág aktiváció lefékezésében az mTNF- α által indukált TGF- β részvétele figyelhető meg.

Mindent összevetve eredményeink rámutatnak az adenozin A₃ receptor és mTNF- α szerepére makrofágok által kiváltott gyulladásos válaszok szabályozásában. Az ezeket a molekulákat megcélzó szerek - A₃R antagonisták vagy mTNF- α induktorok - lehetséges terápiás eszközök lehetnek különböző gyulladásos betegségek kezelésében.

7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/207/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

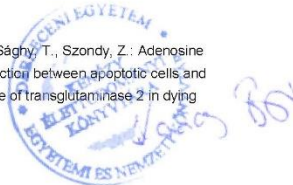
Jelölt: Pallai Anna
Neptun kód: M16P3M
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **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-[béta]: therapeutic
Implications.
J. Immunol. 196 (3), 1146-1157, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1501573>
IF: 4.922 (2014)
2. Duró, E., **Pallai, A.**, Köröskényi, K., Sarang, Z., Szondy, Z.: Adenosine A3 receptors negatively
regulate the engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation.
Immunol. Lett. 162 (2PtB), 292-301, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.06.014>
IF: 2.512

További közlemények

3. Sándor, K., **Pallai, A.**, Duró, E., Legendre, P., Couillin, I., Sághy, 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



4. Yen, J. H., Lin, L. C., Chen, M. C., Sarang, Z., Leong, P. Y., Chang, I. C., Hsu, J. D., Chen, J. H., Hsieh, Y. F., **Pallai, A.**, Koröskényi, K., Szondy, Z., Tsay, G. J.: The metastatic tumor antigen 1-transglutaminase-2 pathway is involved in self-limitation of monosodium urate crystal-induced inflammation by upregulating TGF- β 1.
Arthritis Res Ther. 17 (65), 1-13, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0592-7>
IF: 3.753 (2014)
5. Koröskényi, K., Duró, E., **Pallai, A.**, Sarang, Z., Kloor, D., Ucker, D. S., Beceiro, S., Castrillo, A., Chawla, A., Ledent, C. A., Fésüs, L., Szondy, Z.: Involvement of adenosine A2A receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation.
J. Immunol. 186 (12), 7144-7155, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002284>
IF: 5.788
6. Sarang, Z., Koröskényi, K., **Pallai, A.**, Duró, E., Melino, G., Griffin, M., Fésüs, L., Szondy, Z.: Transglutaminase 2 null macrophages respond to lipopolysaccharide stimulation by elevated proinflammatory cytokine production due to an enhanced α 5 β 3 integrin-induced Src tyrosine kinase signaling.
Immunol. Lett. 138 (1), 71-78, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.03.004>
IF: 2.526

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 22,794

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 7,434

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, 2016.07.21.



AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK

ANGOL NYELVŰ ELŐADÁSOK:

Anna Pallai. **mTNF alpha signaling inhibits LPS-induced pro-inflammatory cytokine formation by upregulating TGF- β in macrophages.** 8th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, 2015, Január 8-10

Anna Pallai. **mTNF alpha signaling inhibits-LPS-induced pro-inflammatory cytokine formation by upregulating TGF-beta in macrophages.** 7th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2014, Január 7-10

Anna Pallai. **mTNFalpha and inhibition of pro-inflammatory cytokine formation.** 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Galyatető, 2013, Január 8-11

Anna Pallai. **GluLys dipeptide produced by transglutaminase inhibits the pro-inflammatory cytokine production of LPS stimulated macrophages.** 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter School, Galyatető, 2012, Január 4-7

POSZTEREK:

Anna Pallai. Aliz Bozó, Réka Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy: **mTNF- α signaling inhibits the pro-inflammatory cytokine production of LPS-stimulated macrophages by upregulating TGF- β .** ECDO 2014, 22nd Euroconference on Apoptosis Cell Death & Rejuvenation, Görögország, Kréta, Hersonissos, 2014, Október 1-4

Anna Pallai. Aliz Bozó, Réka Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy: **mTNF- α signaling inhibits the pro-inflammatory cytokine production of LPS-stimulated macrophages by upregulating TGF- β .** Semmelweis Symposium 2013, Budapest, 2013, November 7-9

Anna Pallai. Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy: **The role of mTNF- α signaling on LPS stimulated macrophages.** 17th International Summer School on Immunology, Horvátország, Rabac, 2013, Szeptember 14-21

Anna Pallai. Aliz Bozó, Réka Tóth, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy: **The role of mTNF- α signaling on LPS stimulated macrophages.** EMDS European Macrophage and Dendritic Cell Society 2012 Meeting, Debrecen, 2012, Szeptember 1-3

Anna Pallai, Zsolt Sarang, Zsuzsa Szondy: **Glutamyl-lysine isodipeptide produced by transglutaminase inhibits the pro-inflammatory cytokine production of LPS stimulated macrophages.** FEBS3+ Meeting "From molecules to life and back", Horvátország, Opatija, 2012, Június 13-16

Krisztina Köröskényi, Katalin Sándor, Anna Pallai, Edina Duró, Zsolt Sarang, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Involvement of adenosine A_{2A} receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation.** FEBS3+ Meeting "From molecules to life and back", Horvátország, Opatija, 2012, Június 13-16

Köröskényi K, Sándor K, Pallai A, Duró E, Sarang Z, Fésüs L, Szondy Z: **Involvement of Adenosine A_{2A} Receptors in Apoptotic Cell Induced Suppression of Inflammation.** Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance, USA, Lewiston, 2011, Július 17-22

Köröskényi K, Pallai A, Fésüs L, Szondy Z: **Adenosine acting via A_{2A} receptors of macrophages takes a part in the anti-inflammatory effect of apoptotic cell uptake and in this way in the termination of inflammatory response.** Magyar Biokémiai Társaság 2009. Évi Vándorgyűlése, Budapest, 2009, Augusztus 23–26

Krisztina Köröskényi, Zsolt Sarang, Anna Pallai, Edina Duró, László Fésüs, Zsuzsa Szondy: **Adenosine is a soluble mediator of immune downregulation induced by apoptotic cells.** 2nd Molecular Cell and Immune Biology Winter School Krompachy, Szlovákia, 2009, Január 5- 8

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Szondy Zsuzsának, hogy segítette és irányította a munkámat.

Őszinte elismerésem szeretném kifejezni, Prof. Fésüs Lászlónak, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet egykori tanszékvezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a munkát az intézetben és köszönet a tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Tózsér Józsefnek, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet tanszékvezetőjének, hogy az intézetben dolgozhattam.

Hálás vagyok, a kollaborációs partnereinknek, az Állatház összes dolgozójának a kiváló munkájukért, melyet a kísérleteim során nyújtottak..

Az első lépéseket a labor munkában szeretném megköszönni Duró Edinának, Dr. Köröskényi Krisztinának, Dr. Sarang Zsoltnak, Dr. Garabuczi Évának, Kiss Beátának, Sándor Katalinnak és Bozó Aliznak és köszönet a barátságukért. A technikai segítségért szeretném kifejezni hálámat Komóczi Editnek és Hartman Zsoltnak, és az intézet minden tagjának köszönet a sok segítségért, támogatásért és barátságért.

És végül, de nem utolsó sorban, nagyon hálás vagyok, drága szüleimnek, férjem szüleinek, észt szüleimnek és barátaimnak, a sok szeretetért és támogatásért, melyeket tanulmányaim és a pályaválasztás során nyújtottak.

Külön köszönet szeretett férjemnek, a folyamatos bátorításért és támogatásért.