

**A SZÖVETI TRANSZGLUTAMINÁZ ÉS AZ
ADENOZIN A_{2A} RECEPTOR SZEREPE A
MAKROFÁGOK GYULLADÁSI
VÁLASZÁBAN**

KÖRÖSKÉNYI KRISZTINA

TÉMAVEZETŐ: PROF. DR. SZONDY ZSUZSA



DEBRECENI EGYETEM

FOGORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2011

A SZÖVETI TRANZGLUTAMINÁZ ÉS AZ ADENOZIN A_{2A} RECEPTOR SZEREPE A MAKROFÁGOK GYULLADÁSI VÁLASZÁBAN

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében a
klinikai orvostudományok tudományágban

Írta::

KÖRÖSKÉNYI KRISZTINA
okleveles molekuláris biológus/biokémikus

Témavezető:

PROF. DR. SZONDY ZSUZSA, az MTA Doktora

Készült a

DEBRECENI EGYETEM
Fogorvostudományi Doktori Iskolája Keretében

A Doktori Szigorlati Bizottság:

Elnök: PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, az MTA Doktora

Tagok: PROF. DR. BUDAY LÁSZLÓ, az MTA Doktora
DR. LÁNYI ÁRPÁD, PH.D.

A Doktori Szigorlat Időpontja: 2011. December 8.

Az értekezés bírálói: PROF. DR. SÍPKA SÁNDOR, az MTA Doktora
PROF. DR. CHRISTOPHER GREGORY, PH.D.

A Bírálóbizottság:

Elnök: PROF. DR. MÁRTON ILDIKÓ, az MTA Doktora

Tagok: PROF. DR. BUDAY LÁSZLÓ, az MTA Doktora
PROF. DR. SÍPKA SÁNDOR, AZ MTA DOKTORA
PROF. DR. CHRISTOPHER GREGORY, PH.D.
DR. LÁNYI ÁRPÁD, PH.D.

Az Értekezés Védésének Időpontja: 2011. December 8. 13:00

Az Értekezés Védésének Helye: DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika Tanterme

1. BEVEZETÉS

1.1. Az apoptotikus sejtek eltakartása

A programozott sejthalál – más néven apoptózis – esszenciális folyamat a szöveti homeosztázis fenntartásában, a szervek kialakulásában és átépülésében a fejlődés során. Az elhalt sejtek felismerésében, eltávolításában, valamint az antigén prezentációban a szervezet fagocitáló sejtjei, különösen a szervezet összes szövetében megtalálható makrofágok játszanak kiemelkedő szerepet.

Az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő hatása

Az apoptotikus programmal elhalt sejtek olyan mechanizmusokon keresztül tükknek el, melyek nemcsak hogy gátolják a makrofágok gyulladásai és immunválasztát, hanem egy részük kifejezetten gyulladáscsökkentő hatású és tolerogenikus. Az apoptotikus sejtek specifikus makrofág receptorok (pl. MerTK, integrin $\alpha_v\beta_3$) által történő felismerése olyan korai jelátviteli válaszokat indít el makrofágokban, melyek közvetlen, oldékony részvétele nélkül képesek gyulladáscsökkentő fenotípusú makrofágok megjelenését kiváltani, gyulladásos helyzetben pedig csökkenteni a Toll-like receptorokon (TLR) keresztül elindított gyulladásai választ. Az elmúlt évtizedben számos ilyen közvetlen mechanizmust azonosítottak. Ezek többsége génexpressziós szinten befolyásolja makrofágok citokin termelését, főként az NF- κ B jelátviteli út gátlásán keresztül. Az apoptotikus sejtfelvétel későbbi fázisában oldékony gyulladáscsökkentő mediátorok termelése indul meg, melyek auto- és parakrin módon hatva indirekt gyulladásgátló hatást fejtenek ki mind az apoptotikus sejtekkel kapcsolatba került makrofágokra, mind a környező szövet sejtjeire. A fenti jelátviteli folyamatok mellett intracelluláris receptorok által aktivált útvonalak is részt vesznek az apoptotikus sejtek gyulladáscsökkentő hatásában. Az elhaló sejtek felvétele nagy mennyiségű celluláris lipidet hoz magával a makrofágokba, melyet a különféle lipidek által aktivált magreceptorok (peroxiszóma proliferátor-aktivált receptorok és liver-X receptorok) ismernek fel. A PPAR β/δ , PPAR γ és LXR magreceptorok esetében már bizonyított, hogy lipid metabolizmust szabályozó szerepükön túl részt vesznek az apoptotikus sejtek felvétel gyulladásos válaszában a szabályozásában is.

1.2. Adenozin

Az adenozin (ADO) az endogén purinok közé tartozó vegyület, mely azon túl, hogy foszfát-észterei az energiatranszfer és a jelátvitel esszenciális elemei, fontos neurotranszmitter és gyulladáscsökkentő vegyület is. Az extracelluláris ADO termelésében számos sejtípus részt vesz: fertőzés, gyulladás, metabolikus és hipoxiás stressz során az endothel sejtek és a neutrofilek hatalmas mennyiségű

ADO-t bocsátanak ki. Emellett az aktivált makrofágok ATP kibocsátásuk által szintén fontos ADO források. Az ADO-ra adott sejtválaszt számottevő mértékben befolyásolja a lokális ADO koncentráció és a célsejtek sejtfelszíni adenoszin receptor (AR) repertoárja.

Adenoszin receptorok

Az AR-k az A-típusú G-protein-kapcsolt receptorok családjába tartoznak és ADO iránti affinitásuk alapján négy altípusba sorolhatók. Nagy affinitású az A1 (A_1R), A2A ($A_{2A}R$) és A3 (A_3R) altípus, míg alacsony affinitású az A2B receptor ($A_{2B}R$). Az A1 és A2 receptorokat eredetileg az intracelluláris cAMP szintre kifejtett hatásuk alapján különítették el: a Gi-kapcsolt A1R-k gátló, míg a Gs-kapcsolt A2R-k aktivációs jelet közvetítenek az adenilát cikláz rendszer felé. A család legkésőbb azonosított tagja, az A3R szintén Gi fehérjével asszociálódik. A receptortípusok eltérő jelátviteli hatása eredményeként a különféle sejtek eltérő receptorösszetétele sejt és össz-szervezeti szinten is komplex szabályozást tesz lehetővé.

Az adenoszin immunmoduláló hatásai

Az ADO és analógjai különféle immun- és gyulladásos betegség (pl. endotoxikus sokk, reumatoid arthritis és nephritis) lefolyására pozitív hatást gyakorolnak, ezáltal terápiás alkalmazásuk manapság sokrétű és számos további haszonnal kecsegtet. Genetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy az ADO-AR rendszer legfontosabb gyulladáscsökkentő és immunszuppresszálo komponense az $A_{2A}R$. Meghatározó szerepét számos tanulmány igazolja: az $A_{2A}R$ nemcsak a monociták/makrofágok LPS-indukálta TNF- α és IL-12 termelését gátolja, hanem a neutrofilek migrációját, oxidatív robbanását és nitrogén monoxid (NO) termelését is. Ezek a gyulladáscsökkentő hatások főként a p38 MAPK, az AP-1 és a NF- κ B által mediált jelátviteli utak módosításán keresztül valósulnak meg. Az $A_{2A}R$ aktiváció a gyulladásos citokin termelés gátlása mellett indukálja a gyulladáscsökkentő és immunszuppresszálo tulajdonságú IL-10-t, mely az ADO számos pozitív immunológiai hatását közvetíti.

1.3. A szöveti transzglutamináz

A transzglutaminázok (TG-k) a Ca^{2+} - és tiol-függő aciltranszferázok családjába tartoznak és fehérjék kovalens kötését katalizálják mind intracellulárisan, mind extracellulárisan. Poszt-transzlációs módosításaik által számos biológiai folyamatban részt vesznek (pl. jelátvitel, sejtadhézió és vándorlás, sebgyógyulás, mineralizáció, apoptózis). A család egyik tagja, a szöveti transzglutamináz (TG2) keresztkötő aktivitása mellett G-fehérje (G_h), protein diszulfid izomeráz, protein kináz és DNS nukleáz funkcióval is rendelkezik. A TG2 főként citoplazmazmatikus enzim, de megtalálható a

sejtmagban, a mitokondriumban, a sejtfelszínen és az extracelluláris mátrixban (ECM) is, ahol az extracelluláris molekulákkal kapcsolatba lépve nem csak a sejt-ECM interakciók kialakításában, hanem a citokinek hozzáférhetőségének a szabályozása által a gyulladásai folyamatok szabályozásában is részt vesz. Ez utóbbi funkció nélkülözhetetlen a látens TGF- β aktivációjához. Emellett a TG2 közös szabályozó kört alkot a gyulladásai citokin gének szabályozásában kulcsszerepet játszó NF- κ B transzkripciós faktorrall is.

A TG2 hiányának következményei makrofágokban

A TG2 szerepe az apoptózisifüggő fagocitózisban a citoskeletális átrendeződés szabályozása valamint a gyulladásos és autoimmun folyamatok kivédése. Ennek megfelelően TG2 hiányában nem csak az apoptótikus sejtek eltakarítása, hanem a makrofágok TGF- β és gyulladásai citokin termelése is zavart szenved. Bár a TG2 hiányos egerek életképesek és normális fejlődét mutatnak, 12 hónapos koruk után SLE-szerű splenomegáliával, autoantitestek megjelenésével, és glomerulonephritissel társult autoimmun betegséget hordoznak, melyet valószínűleg az apoptótikus sejtek tartós jelenléte okoz. Emellett a TG2 hiánya olyan, a krónikus gyulladás talaján kialakult megbetegedések kialakulásához is vezethet, mint például az atherosclerosis.

A TG2 a fagocita receptor integrin β_3 és a hídképző molekula MFG-E8 összekapcsolásának elősegítésével járul hozzá a fagocitotikus portálok kilakuláshoz az apoptótikus sejtek fagocitózisa során. TG2 hiányában az apoptótikus sejtek által indukált β_3 integrin jelátvitel zavart okoz a RhoG és Rac1 aktivációjában, valamint ezek következményeként a citoskeletális átrendeződésben. A fagocitotikus gépezet elégtelenségének kompenzálására a TG2 hiányos makrofágokban megnövekszik mind az integrin β_3 , mind a RhoG szintje, mely fokozott adhézió-indukált integrin β_3 jelátvitelt eredményez. Az apoptótikus sejtek elégtelen felvétele mellett a TG2 hiányos egerek csökkent szuperoxid termeléssel, viszont emelkedett neutrofil fagocitózissal reagálnak gyulladásai stimulusra. Ezzel szemben a monocita/makrofág rendszer által közvetített gyulladásai válaszok – mint például a gyulladásai citokinek kibocsátása – kifejezettebbek TG2 hiányos egerekben, mint a vad típusúakban.

1.4. A patogének makrofágok általi felismerése

A patogének elleni védelemben fontos szerepet játszanak a szöveti makrofágok és a dendritikus sejtek patogén-asszociált molekuláris mintázat (PAMP) felismerésére alkalmas „pattern recognition receptortai” (PRR). A PPR-k közé tartoznak a Toll-like receptorok (TLR-k), lektinek, scavenger receptorok és az integrinek. Közülük a TLR-k játszanak a legmeghatározóbb szerepet a nem specifikus immunrendszer aktiválásában.

A TLR4 és jelátviteli rendszere

A TLR4 egy Gram-negatív bakteriális sejtfallkomponens, a lipopoliszaccharid (LPS) felismeréséért felelős receptorkomplexet foglal magába. A hatékony TLR4-mediált sejtaktivációhoz a specifikus felismerésen túl a receptorkomplex különböző tagjai (LBP, CD14, MD-2, TLR4) közötti fehérje-fehérje kölcsönhatás is elengedhetetlen.

A TLR4 ligandkötés hatására Toll-interleukin-1 receptor doménen (TIR) keresztül összekapcsolódik adapter molekulájával, a Myd88-al, melynek feladata a receptor összekötése az jelátviteli út további elemeivel. A Myd88-függő jelátvitel két transzkripció faktor – aktivátor protein 1 (AP-1) és a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) – közreműködésén keresztül vezet a gyulladásos citokinek termeléséhez. Az NF- κ B nyugvó sejtekben egy gátló alegységet, az I κ B α -t köti. Meghatározott extra- vagy intracelluláris jel esetén – mint például a TLR4 aktiváció – az I κ B-kináz komplex aktiválódik, és foszforilálja az I κ B α -t. A foszforiláció eredményeként az I κ B α lebomlik, az NF- κ B pedig felszabadul és a sejtmagba vándorol, ahol célgénjeinek promóteréhez kötődve azok átírását serkenti. Ilyen gének például a gyulladásos citokin interleukin-1 és -6 (IL-1, IL-6), a tumor nekrosis faktor α (TNF- α), az adhéziós molekulák és az akut fázis fehérjék. Több tanulmány is megerősíti egy másik, Myd88-független útvonal létezését, alternatív adapter molekulákon (TRAM, TRIF) keresztül IRF3 és IRF7 (interferon szabályozó transzkripció faktor 3/7) aktivációt, valamint lassú NF- κ B aktivációt indít be.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Korábbi vizsgálatainkból ismert volt, hogy TG2 hiányában egyrészt zavart az apoptótikus sejtek eltakarítása, másrészt a makrofágok fokozott gyulladásási citokin termeléssel reagálnak gyulladásokeltő stimulusokra. Mivel az apoptótikus sejtfevétel gyulladáscsökkentő hatásában és az LPS által indukált gyulladás válasz főkentartásában fontos szerepet játszó TGF- β aktivációja TG2 hiányában elmarad, ezért kézenfekvő az a feltételezés, miszerint TG2 hiányos makrofágokban az aktív TGF- β hiánya és a fokozott gyulladásási citokin termelés között ok-okozati összefüggés van. Munkánk során ezt a hipotézis kívántuk megvizsgálni. Konkrét kérdéseink a következők voltak:

1. Az aktív TGF- β hiánya felelős-e a megemelkedett gyulladásási citokin termeléséért TG2-t nem expresszáló makrofágokban?
2. Ha nem, akkor milyen egyéb, TGF- β -tól független abnormalitásokra vezethető vissza a TG2 hiányos makrofágok fokozott gyulladásási válasza?

TG2 makrofágokon végzett előzetes kísérleteink megkérdőjelezték a TGF- β központi és kizárólagos szerepét az apoptótikus sejtek gyulladáscsökkentő hatásában, ezért potenciális résztvevők után kutattunk. Így került látóterünkbe az ADO, mellyel kapcsolatban az alábbi kérdéseink merültek fel:

1. Szerepet játszhat-e az ADO oldékony, gyulladáscsökkentő szignált közvetítő vegyületként az apoptótikus sejtfevétel során?
2. Ha igen, akkor a főként gyulladáscsökkentő jelet közvetítő A_{2A}R stimuláción keresztül fejtí ki a hatását?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleti állatok

Munkánk során 3 hónapos vad típusú (C57B/6 és FVB), A_{2A}R hiányos (FVB alapon) TG2 hiányos (C57B/6 alapon), PPAR δ hiányos (129 SvJ alapon) és LXR hiányos (C57Bl/6x129Sv kevert alapon) egereket használtunk. Minden kísérlet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével történt.

Makrofágok izolálása és tenyésztése

A makrofágokat steril fiziológias 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 μ M 2-merkaptotetanol) termosztátban (37°C, 5% CO₂) tenyésztettük. A le nem tapadt sejteket az izolálás után 3-4 órával, majd naponta lemostuk. Csontvelői sejtekből differenciáltatott makrofágok esetében a sejteket vad típusú és PPAR δ knock out egerek combcsontjából izolált csontvelőből nyertünk ki, majd DMEM tápfolyadékban (10% FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin, 2 mM L-glutamin, 1 mM Na-piruvát, 50 μ M 2-merkaptotetanol) GM-CSF jelenlétében (10% L929 fibroblaszt sejtfelülíszo) termosztátban 10 napon keresztül tenyésztettük. A le nem tapadt sejteket a negyedik napot követően naponta lemostuk.

Adenovirális génbevitel

Olyan rekombináns, replikáció-deficiens adenovirális vektorokat termeltünk (AdEasy XL system, Agilent Technologies) melyek LacZ-t, vad típusú TG2-t vagy különböző TG2 mutánsokat (szekréció-deficiens mutáns, guanin nukleotid kötő mutáns, keresztkötő mutáns) kódoltak. A vírusiterek 293T sejteket történt meghatározása után a vírusokkal makrofágokat fertőztünk. A LacZ expresszióját X-gal festéssel, a TG2 szintjeit pedig Western blottal határoztuk meg.

Apoptózis indukció *in vitro*

Az apoptotikus targetsejtként használt timocitákat 4 hetes vad típusú egerek timuszából izoláltuk. Az apoptózist 24 órás, szérummentes RPMI médiumban (100 U/ml penicillin/streptomycin) történő tenyésztéssel értük el. NB4 promielocitás leukémia sejtek esetében korábbi tanulmányok alapján As₂O₃-kezeléssel (10 μ M, 12 óra) indukáltunk apoptózist. FACS analízis (AnnexinV-FITC/propidium-jodid) alapján mindkét módszer esetében az apoptotikus sejtek aránya meghaladta a 80%-t a sejt kultúrákban. Az apoptotikus sejteket minden kísérlet során 10x feleslegben adtuk a makrofágokhoz.

A makrofágok adenosin termelésének meghatározása

A_{2A}R^{+/+} hasüregi makrofágokat apoptotikus sejtekkel inkubáltunk 2 órán keresztül. Egyes kísérletek esetében a makrofágokat cytochalasin D-vel előkezeltük (50 mM). Az apoptotikus sejteket a 2 óra leteltével lemostuk, a makrofágokat pedig további 5 órán keresztül inkubáltuk friss médiumban. Az inkubációt követően a sejtfelülűszoikat összegyűjtöttük, fehérjementesítettük (0.6 N HClO₄) majd az ADO meghatározásig -80°C-on tartottuk. Az ADO mennyiségének meghatározása reverz fázisú HPLC technikával történt.

A makrofágok sejtfelszíni A_{2A}R, CD14 és TLR4 szintjeinek meghatározása

A_{2A}R^{+/+} és A_{2A}R^{-/-} hasüregi makrofágokat apoptotikus sejtekkel kezeltünk 1 órán keresztül. Bizonys kísérletek során a makrofágokat Actinomycin D-vel (5 µg/ml) vagy cikloheximiddel (0.1 µg/ml) 30 percig előinkubáltuk. CD14 és TLR4 kimutatás esetében TG2^{+/+} és TG2^{-/-} hasüregi makrofágokat 200 ng/ml LPS-sel kezeltünk. Az apoptotikus sejteket és az LPS-t 1 óra elteltével lemostuk, a makrofágokat pedig további 5 órán keresztül inkubáltuk friss médiumban. A PPARδ és az LXR A_{2A}R-t indukáló hatásának vizsgálatakor A_{2A}R^{+/+} hasüregi makrofágokat emelkedő koncentrációjú LXR agonista 22-R(OH)-koleszterollal (Sigma Aldrich) vagy PPARδ agonista GW501516-tal (Glaxo Smith Kline) kezeltük 3 órán át. Az inkubációs idők letelte után a sejteket mostuk, összegyűjtöttük majd blokkoltuk (50% FBS, 45 perc). A sejtfelszíni receptorokat anti-egér-A_{2A}R antitesttel jelöltük, majd FITC-konjugált másodlagos antitestekkel detektáltuk. A CD14 és a TLR4 esetében a jelölés és a detektálás egy lépésben történt anti-CD14-FITC és anti-TLR4-FITC antitestek segítségével. Kontrollként izotípusazonos immunoglobulinokat használtunk minden kísérlet során. A jelölt sejtek analízise FACSCalibur készüléken (BD Biosciences), az adatok kiértékelése pedig WinMDI 2.9 programmal történt.

A makrofágok génexpressziós változásainak meghatározása

Vad típusú és A_{2A}R^{-/-} hasüregi illetve vad típusú, LXR^{-/-} és PPARδ^{-/-} csontvelői makrofágokat különféle target sejtekkel (apoptotikus/élő/anti-CD3-mal előkezelt élő timociták), valamint TG2^{+/+} és TG2^{-/-} hasüregi makrofágokat 200 ng/ml vagy LPS-sel kezeltünk 1 órán át. Az inkubáció után a target sejteket és az LPS-t lemostuk, a makrofágokból pedig további 2 órán át inkubáltuk friss médiumban. Az inkubáció eltelté után TRI-reagenssel totál RNS-t izoláltunk. Az mRNS cDNS-sé történő átírásához High Capacity cDNA RT Kitet (Applied Biosystems) használtunk, a reverz transzkripciót pedig ABI 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) készüléken futtattuk. A génexpressziós változások detektálása valós idejű kvantitatív PCR technikával történt, melyhez génspecifikus FAM-MGB-jelölt primereket és próbákat tartalmazó oligomixeket (TaqMan Gene

Expression Assay-k, Applied Biosystems) használtunk. A mintákat ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) platformon futtatuk triplikátumokban. Az adatok kiértékelése SDS 2.1 programmal (Applied Biosystems) történt. A génexpressziós szinteket komparatív CT (ddCT) módszerrel határoztuk meg, melyhez normalizáló génként ciklofilin D-t használtuk.

A makrofágok citokintermelésének meghatározása

Vad típusú és $A_{2A}R^{-/-}$ makrofágokat apoptotikus sejtekkel inkubáltunk, egyes kísérletekben $A_{2A}R$ -az specifikus agonista CGS21680 (10 nM) vagy az $A_{2A}R$ -specifikus antagonistája SCH442416 (10 nM) jelenlétében is. Az apoptotikus sejteket 1 óra fagocitózis után lemostuk, a makrofágokat pedig további 5 órán keresztül inkubáltuk friss médiumban a CGS21680 és a SCH442416 visszapótlása mellett. Az inkubációs idő letelte után a sejtfelülüléseket 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.

A TNF- α mRNS stabilitásának meghatározása

Vad típusú és $TG2^{-/-}$ hasüregi makrofágokat LPS-sel (200 ng/ml) 1 órán keresztül előinkubáltunk, majd a további transzkripciót Actinomycin D adásával (1 μ g/ml) leállítottuk. A totál RNS-t különböző inkubációs idők után nyertük ki. A TNF- α mRNS szintjeinek meghatározása a fentebb leírtak szerint történt.

Vad típusú és $A_{2A}R$ hiányos makrofágok fagocitózisának vizsgálata

A $A_{2A}R^{+/+}$ és $A_{2A}R^{-/-}$ makrofágokat egy éjszakán keresztül CMTMR (5-,6-)(((4-klorometil)benzoi)amino) tetrametilrodamin; 10 μ M), festékkel, az apoptotikus timocitákat pedig CFDA (6-karboxi-3,6-diacetilfluorescein; 6 μ M) festékkel jelöltük. A makrofágokat és az apoptotikus sejteket 1 órán keresztül együttesen inkubáltunk, majd 1 óra fagocitózis után az apoptotikus timocitákat lemostuk. Kontrollként 4°C-on fagocitáló makrofágokat használtunk. Mósást követően a sejteket áramlási citometriával analizáltuk a korábbi részben leírtak szerint. Az apoptotikus sejtek makrofágokban történő megjelenítéséhez 30 perc fagocitózis után gyűjtöttük be a makrofágokat, melyeket ezután mostunk, fixáltunk (etanol/aceton 1:1 keveréke; 10 perc), majd Olympus FV1000 konfokális lézer szkennelő mikroszkópon vizsgáltunk. Minden meghatározás során 500 makrofág esetében számoltuk le a felvett apoptotikus sejtek számát.

A makrofágok nitrogén monoxid kibocsátásának vizsgálata

Vad típusú és $A_{2A}R^{-/-}$ makrofágokat apoptotikus sejtekkel inkubáltunk, melyeket 1 óra fagocitózis

után lemestük. A makrofágokat további 1 órán keresztül inkubáltuk friss médiumban, majd a sejt-felülészók nitrit koncentrációját Griess-Ilosvay reakcióban detektáltuk. A mintákból és Na-nitrit standard-sorból technikai triplikátumokat készítettünk a meghatározáshoz. Az abszorbanciát 550 nm-en mértük és kalibrációs görbe segítségével állapítottuk meg a minták nitrit tartalmát.

***In vivo* neutrofil migrációs vizsgálat**

A_{2A}R^{+/+} és A_{2A}R^{-/-} egereknél steril peritonitist idéztünk elő 2 ml 4% tioglikolát intraperitoneális beinjektálásával. Négy nappal később az egereket apoptotikus sejtekkel (2×10⁶ apoptotikus sejt/2 ml steril fiziológiás sóoldat), illetve kontrollként steril fiziológiás sóoldattal újraoltottuk. Egyes esetekben az apoptotikus sejtekhez anti-MIP-2 antitestet, anti-KC antitestet, valamint izotípusazonos kontroll antitesteket is adtunk. A kezelések után 3 órával a korábban leírt módszerrel kinyertük a hasüregi sejteket és a mosófolyadékot. A sejtpopulációkat áramlási citometriás analízissel vizsgáltuk, melyhez neutrofil specifikus Gr-1-FITC (Ly-6G és LY-6C, BD Pharmingen) monoklonális antitestet, kontrollként megfelelő izotípusú IgG-t (V450 patkány IgG2bκ, BD Pharmingen) használtunk. A jelölést a korábbi részben leírtak szerint végeztük. A hasüregi mosófolyadék MIP-2 és KC tartalmát ELISA módszerrel határoztuk meg.

Western blot

LPS kezel (200 ng/ml) TG2^{+/+} és TG2^{-/-} hasüregi makrofágokhoz eltérő inkubációs időt követően 2x Laemmli puffert adtunk, majd felforraltuk a mintákat. A fehérjék elválasztása SDS PAGE gélen, detektálásuk pedig PVDF membránon történt anti-IκKβα, anti-cSrc, anti-phospho(Tyr416)-Src, anti-integrin β₃, anti-phospho-(Tyr⁴⁷⁴) integrin β₃, anti-TG2 és anti-β-actin antitestek felhasználásával. Egyes kísérletekben a makrofágokat szolubilis vitronektinnel (1μg/ml, 30 perc) vagy Src specifikus kináz inhibitor PP2-vel (24 óra, 2 μM; Tocris) kezeltük az LPS kezelést megelőzően.

A NK-κB p65 nukleáris transzlokációjának vizsgálata

TG2^{+/+} és TG2^{-/-} hasüregi makrofágokat LPS-sel kezeltük (200 ng/ml) 30, 60 és 120 percen keresztül. Ezt követően a sejtekből sejtmagot izoláltunk (Nuclei EZ Kit, Sigma Aldrich) a gyártó által mellékelt protokollok szerint. Az NF-κB p65 alegységének magi szintjét TransAM p65 Kit (Active Motif) segítségével, gyártó által mellékelt használati utasítás lépései szerint matároztuk meg.

Statisztikai analízis

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 (p<0.05), citokin array esetében pedig ANOVA tesztet használtunk (p<0.05).

4. EREDMÉNYEK

4.1. AZ INTEGRIN $\alpha_5\beta_3$ -MEDÁLT SRC JELÁTVITEL ZAVARA TG2 HIÁNYOS MAKROFÁGOKBAN FOKOZOTT GYULLADÁSI VÁLASZT OKOZ

TG2 hiányában kifejezettebb a makrofágok LPS-indukálta gyulladásási citokin termelése

Munkánk első lépéseként ELISA technikával meghatároztuk a vad típusú hasüregi makrofágok gyulladásási citokin termelésének kinetikáját és azt találtuk, hogy az LPS-indukálta IL-6 és TNF- α termelés 6 órával a kezelést követően tetőzik, majd változatlan marad az azt követő 20 órában. Míg IL-6 esetében az indukció csak a kezelést követő első óra után mutatható ki, addig a TNF- α már az LPS adását követő első óra során is jelentős mennyiségben van jelen a sejtfelülűszókban. Ez azt mutatja, hogy a makrofágban TNF- α tárolódik, mely LPS-stimuláció hatására kiválasztásra kerül. Bár TG2 hiányában az IL-6 és TNF- α termelés fent leírt kinetikája nem változott, a makrofágok által termelt citokinek szintje minden időpontban meghaladta a vad típusú sejtekben detektáltakat. A TG2 hiánya tehát LPS iránti fokozott érzékenységhöz vezet makrofágokban.

A TG2 hiányos makrofágok fokozott gyulladásási citokin termelése nincs összefüggésben az aktív TGF- β hiányával

Mivel a TG2 szükséges a látens TGF- β aktiválásához, valamint a TGF- β nem csak apoptotikus sejtfelvétel, hanem a TLR4 stimulációt követő gyulladásási válaszban is kifejti immunszuppresszálo hatását, a következőekben azt vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a TG2 hiányos makrofágok fokozott gyulladásási válasza, és a TGF- β aktivációjának defektusa között. Azt találtuk, hogy TG2^{-/-} makrofágok valóban nem termelnek kimutatható mennyiségű aktív TGF- β -t. Mivel sem neutralizáló anti-TGF- β antitest, sem rekombináns TGF- β adása nem befolyásolta makrofágok LPS kezelést követő korai gyulladásási citokin termelést, úgy gondoljuk, hogy a TGF- β nem játszik szerepet a makrofágok korai gyulladásási válaszában, illetve hogy nem az aktív TGF- β hiánya felelős az LPS-kezelt TG2^{-/-} makrofágok megemelkedett IL-6 és TNF- α termeléséért.

TG2 hiányában csökkent a makrofágok nyugalmi IkBa szintje

Emlősökben az LPS molekula felismerében kulcsszerepet tölt be a TLR4 és koreceptora a CD14. Annak kiderítésére, hogy vajon az LPS-érzékelő receptorok megváltozott szintje áll-e a TG2 hiányos makrofágok fokozott gyulladásási válaszában háttérben, áramlási citometrával meghatároztuk

mind a TLR4, mind a CD14 felszíni kifejeződését vad típusú és TG2^{-/-} makrofágokban. Eredményeink azt mutatják, hogy egyik receptor szintjét sem befolyásolja a TG2 hiánya, tehát nem a LPS felismeréséért felelős mechanizmusok defektusa áll a TG2^{-/-} makrofágok LPS iránti fokozott érzékenységének hátterében.

A gyulladásos citokin termelés szabályozása sokrétű és számos jelátviteli szinten kontrollált folyamat. Mivel a szabályozás első lépése a génszinten valósul meg, ezért következő lépésben RT-qPCR módszerrel meghatároztuk a két, általunk vizsgált citokin mRNS-ének nyugalmi és LPS adását követő szintjét. A vártan megfelelően kezeletlen makrofágokban egyik citokin mRNS-e sem volt kimutatható, LPS jelenlétében pedig mind az IL-6, mind a TNF- α génje indukálódott. TG2 hiányos makrofágokban azonban az indukció mértéke TNF- α esetében duplája, IL-6 esetében pedig mintegy négyszerese volt a vad típusú sejtekben mértékhez képest. Annak eldöntésére, hogy az általunk tapasztalt különbségeket eltérő génkifejeződés vagy megváltozott mRNS stabilitás következményei-e, megismételtük a kísérletet transzkripció gátló szer (Actinomycin D) jelenlétében és követtük a TNF- α mRNS szintjében bekövetkező csökkenést. A TNF- α transzkriptumok degradációja azonos kinetikát mutatott a vad típusú és a TG2 hiányos makrofágokban. Összességében tehát a TG2 nem befolyásolja az mRNS degradációját, viszont az enzim hiányában fokozottabb az IL-6 és a TNF- α átíródása. Mivel az LPS gyulladásos citokin termelést indukáló hatásában meghatározó szerepet tölt be az NF- κ B transzkripció faktor aktivációja, illetve az NF- κ B útvonal működéséhez elengedhetetlen az I κ B α negatív szabályozó alegység proteolitikus lebomlása, ezért LPS adását követően meghatároztuk a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} makrofágok I κ B α szintjeit. Az I κ B α lebomlása azonos kinetikát mutatott TG2 jelenlétében és hiányában, viszont az I κ B α nyugalmi szintje szignifikánsan alacsonyabb volt TG2^{-/-} makrofágokban a vad típusúakhoz képest.

A gátló I κ B α proteaszómális lebomlását követően a p50 (NF- κ B1) és p65 (RelA) alegységekből álló NF- κ B dimer szabaddá válik és a sejtmagba vándorolva célgénjeinek (pl. IL-6, TNF- α) átíródását indítja el. A két alegység közül a p65 esszenciális az indukció létrejöttéhez. Következő lépésként tehát meghatároztuk az NF- κ B p65 alegység sejtmagba történő transzlokációját (TransAM NF- κ B p65 kit). Az alacsony nyugalmi I κ B α szinttel párhuzamosan TG2 hiányos makrofágok alap és LPS-indukálta sejtmagi p65 szintje a vad típusúakénál magasabb volt. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a TG2 hiánya egy, az I κ B α szabályozásában szerepet játszó jelátviteli út befolyásolásán keresztül hat a makrofágok gyulladásos citokin termelésére.

A sejtfelszíni TG2 csökkenti a TG2 hiányos makrofágok fokozott LPS-érzékenységét

Korábbi tanulmányok már igazolták az NF- κ B és a TG2 közötti kapcsolatot; LPS-kezelt mikroglia sejtekben például a TG2 egy újonnan feltárt jelátviteli úton keresztül képes aktiválni az NF- κ B-t. Ebben a szerepében a TG2 fehérje polimerizációt katalizáló hatása a domináns. Másrészt, a TG2 fokozott kifejeződése az integrin jelátvitelen keresztül hatva erősíti az NF- κ B aktivációját rákos sejtekben. Ha ezek a mechanizmusok makrofágokban is léteznek, akkor a TG2 hiánya nem fokozott, hanem éppen ellenkezőleg, csökkent LPS-választ eredményezne. Annak kiderítésére, hogy melyik TG2 funkció szükséges az LPS által kiváltott gyulladásos citokin termelés féléntartásához, adenovirális rendszert felhasználásával olyan TG2 mutáns konstrukciókat juttattunk be makrofágokba, melyek egy-egy adott TG2 funkcióra nézve defektust hordoztak. A mutációk a következők voltak: keresztkötő mutáns (TG2-X: Cys²⁷⁷ $\rightarrow$ Ser csere); két guanin nukleotid kötő mutáns (TG2-G1: Lys¹⁷² $\rightarrow$ Asn és Phe¹⁷³ $\rightarrow$ Asp csere; TG2-G2: Glu⁵⁷⁸ $\rightarrow$ Gln és Arg⁵⁷⁹ $\rightarrow$ Glu csere), és a szekréciós mutáns (TG2-S: Tyr²⁷⁴ $\rightarrow$ Ala csere). A makrofágok IL-6 termelésére kifejtett hatásokat vizsgálva azt találtuk, hogy csak a vad típusú és a keresztkötő mutánsok bejuttatásával volt teljes mértékben visszafordítható a makrofágok fokozott LPS-érzékenysége, a szekréciós és a két nukleotid kötő mutáns hatástalannak bizonyult. Ezek a kísérletek azt bizonyítják, hogy a sejtfelszíni TG2 negatív módon befolyásolja az LPS-indukált gyulladásos citokin termelést, illetve hogy ez a szabályozás független a TG2 keresztkötő aktivitásától. Az eredmények másrészt megerősítik azokat a korábbi eredményeinket, mely szerint nem a TGF- β aktiváció elmaradása –melyhez a TG2 keresztkötő funkciója elengedhetetlen- felelős a TG2 hiányos makrofágok fokozott LPS-indukált gyulladásos citokin termeléséért.

A megváltozott integrin $\alpha_v\beta_3$ jelátvitel felelős az LPS-indukált gyulladásos citokin termelés felerősödéséért TG2 hiányos makrofágokban

A sejtfelszíni TG2 integrinkötő koreceptoroként csökkenti az Src tirozin kinázok aktivitását. Ismert továbbá, hogy az integrin $\alpha_v\beta_3$ (ITG $\alpha_v\beta_3$) stimulációja az Src/NF- κ B jelátviteli úton hatva indukálhatja a gyulladásos citokinek termelését. Ezek alapján megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy nem az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitelen történő zavar áll-e a TG2 hiányos makrofágok esetében tapasztalt megváltozott I κ B α és magi NF- κ B p65 szintek, illetve a fokozott gyulladásos citokin termelés hátterében. Az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitel szolubilis vitronektinnel történő gátlása mRNS szinten csökkentette a TG2^{-/-} makrofágok LPS-indukált gyulladásos citokin termelést, mely azt mutatja, hogy az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitel meghatározó szereppel bír a TG2^{-/-} makrofágok LPS iránti túlzott érzékenységében.

Érdekes módon vad típusú sejtekben a vitronektin kezelés ellentétes hatást váltott ki, mind az IL-6, mind a TNF- α szintje megemelkedett az ITG $\alpha_v\beta_3$ gátlásakor. Ezzel párhuzamosan az LPS-indukálta I κ B α degradáció TG2^{+/+} sejtekben fokozódott, míg TG2^{-/-} makrofágokban mérséklődött vitronektin kezelés hatására. Mivel ismert, hogy a sejtfelszíni TG2 keresztkötheti a szolubilis vitronektint, valamint a keresztkötött vitronektin gátlás helyett aktiválja az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitelt, ezért vad típusú sejteken megismételtük a vitronektines kísérletet nem penetráló TG2 inhibitor (R294) jelenlétében, mely a TG2 keresztköthető aktivitását – ezáltal a keresztkötött vitronektin képződését is – gátolja. Az inhibitor hozzáadása azonban nem befolyásolta a korábbi eredményeket, tehát kizárhattuk a keresztkötött vitronektin által közvetített reverz hatást rendszerünkben. Ezek a megfigyelések összességében arra utalnak, hogy vad típusú makrofágokban a ligand-aktivált ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitel nem játszik döntő szerepet az LPS-indukált gyulladásos citokin termelés szabályozásában, TG2 hiányos sejtekben viszont jelentős mértékben fokozza azt.

Az integrin $\alpha_v\beta_3$ -mediált Src tirozin kináz aktiváció TG2 hiányában megfigyelt fokozódása felerősödött NF- κ B jelátvitelt eredményez makrofágokban

Következő lépésként a TG2 hiányos makrofágok Src tirozin kináz (SFK) aktivitását tanulmányoztuk. Az SFK-k erősen konzerválódott alosterikus enzimek, melyek egyrészt fontos tagjai az integrin jelátviteli útnak, másrészt szerepet játszanak az LPS jelátvitel szabályozásában. Mivel 416-os pozícióban lévő tirozin oldalláncuk foszforilációja kulcsfontosságú lépés aktivációjuk során, ezért kísérleteink az Src Tyr⁴¹⁶ foszforilációs állapotának vizsgálatára irányultak. Míg az Src alapszint tekintetében nem tapasztaltunk különbséget TG2^{+/+} és TG2^{-/-} makrofágok között, addig a Tyr⁴¹⁶ foszforiláltsági szintje szignifikánsan magasabb volt TG2^{-/-} makrofágokban a vad típusúakhoz képest. Az irodalmi adatoknak megfelelően LPS kezelés hatására mindkét makrofágtípusban megemelkedett a foszforilált Src mennyisége.

Az ITG β_3 intracelluláris doménjének Tyr⁷⁴⁷ és Tyr⁷⁵⁹ oldalláncai potenciális Src szubsztrátként fontos szerepet töltenek be az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitelben. Mivel a Tyr⁷⁴⁷ foszforilációja nemcsak a ligandkötéshez, hanem az intracelluláris jelátvitelhez is elengedhetetlen lépés, ez a kitüntetett oldallánc fontos szerepet játszik az integrinek által mediált „outside in” és az „inside out” jelátvitelben. A makrofágok ITG $\alpha_v\beta_3$ Tyr⁷⁴⁷ foszforiláltsági állapotának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy míg vad típusú sejtekben kis mértékű a Tyr⁷⁴⁷ foszforiláltsága, addig TG2^{-/-} makrofágokban magas szintet mutat. Emellett – korábbi megfigyeléseinket megerősítve – azt találtuk, hogy a TG2 hiányát – és egyben a fagocitózis zavarát is – a makrofágok megnövekedett a sejtfelszíni ITG $\alpha_v\beta_3$ szinttel kompenzálják. Az ITG β_3 magas sejtfelszíni expressziója és foszforiláltsági állapota együttesen

fokozott ITG β 3 aktivációt eredményez TG2 hiányos makrofágokban. Mivel az ITG β 3 és az SFK-k foszforilációja reciprok folyamatok, az ITG $\alpha_v\beta_3$ szolubilis vitronektinnel történő blokkolása csökkentette az Src foszforiláltságát, az Src specifikus gátlása [PP2 inhibitor: 4-amino-5-(4-klorofenil)-7-(t-butil)pirazolo[3,4-d]pirimidine] pedig a foszfo- ITG $\alpha_v\beta_3$ szintjét mérsékelte.

Ezután azt próbáltuk kideríteni, hogy vajon van-e összefüggés a TG2^{-/-} makrofágok fokozott Src aktivitása és csökkent IkB α alapszintje között. Az Src gátlása egyrészt lassította TG2^{+/+} és TG2^{-/-} makrofágokban az IkB α LPS kezelést követő lebomlását, másrészt kiegyenlítette a TG2^{+/+} és TG2^{-/-} IkB α szinteket mind nyugvó, mind LPS-stimulált makrofágokban. Az eredményeink tehát megerősítik korábbi feltevésünket, mely szerint a TG2^{-/-} makrofágok IkB α szintjének csökkenéséért a felerősödött Src aktivitás a felelős. A TG2^{+/+} és TG2^{-/-} makrofágok IL-6 és TNF- α génexpressziója az IkB α szintekkel párhuzamosan mozgott: PP2 jelenlétében mindkét gén átírása azonos szintre csökkent le.

Összességében eredményeink azt bizonyítják, hogy a TG2 hiányos makrofágok LPS iránti fokozott érzékenységének kialakulásában döntő szerepet játszik Src tirozin kinázok ITG $\alpha_v\beta_3$ általi fokozott aktiválása.

4.2. AZ ADENOZIN ÉS AZ A_{2A} RECEPTOR SZEREPE AZ APOPTÓTIKUS SEJTFELVÉTEL GYULLADÁSCSÖKKENTŐ HATÁSÁBAN

Apoptotikus sejtek felvétele adenosin felszabadulást és A_{2A} receptor indukciót vált ki makrofágokban

Tanulmányunk elején az első és legfontosabb kérdés az apoptotikus sejtekkel kezelt makrofágok potenciális ADO termelésének vizsgálata volt. Vad típusú primer hasüregi makrofágok sejtfelül-úszóiban apoptotikus sejtekkel való kezelést követően kimutatható volt az ADO, mennyisége pedig az A_{2A} receptor altípus affinitási tartományába esett. Kontroll médium, valamint kezeletlen makrofágok és apoptotikus timociták sejtfelülúszibant az ADO nem volt kimutatható. Az ADO felszabadulás függetlennek bizonyult az alkalmazott apoptotikus sejt típusától: mind apoptotikus timocitákkal, mind apoptotikus neutrofil-szerű NB4 sejtekkel kiváltható volt. Annak eldöntésére, hogy az apoptotikus sejt-makrofág kontaktus hatására („tether and tickle”), vagy az apoptotikus sejtek felvételekor aktiválódott jelátviteli utak indítják el az ADO kibocsátást, a kísérletet megisméltük gátolt fagocitózissal (citokalazin D-előkezelt) makrofágokkal is és azt találtuk, hogy az

apoptotikus sejtek felvételekor keletkező szignál(ok) felelősek a makrofágok ADO kibocsátásának kiváltásáért.

Az apoptotikus sejt felvétel a makrofágokban az ADO kibocsátás mellett megnövekedett sejt felszíni $A_{2A}R$ szintet is kiváltott. A megnövekedett $A_{2A}R$ szinttel kapcsolatban három fontos megfigyelést tettünk: 1) az $A_{2A}R$ indukció génszinten valósul meg, 2) az $A_{2A}R$ szint megemelkedése fagocitózis-függő és nem igényli a „klasszikus” PS-alapú felismerő mechanizmusokat, 3) az $A_{2A}R$ szint megnövelése specifikus az apoptotikus sejtek felvételére, élő, nekrotikus vagy antitesttel burkolt sejtekkel nem volt kiváltható.

Az apoptotikus sejtek fagocitózisa és degradációja nagy mennyiségű celluláris lipidet hoz a makrofágokba, ezért a fentiek mellett vizsgáltuk két, az apoptotikus sejtek felvételét és azok gyulladáscsökkentő hatását fokozó lipid-szenzor, a PPAR δ és az LXR magreceptorok lehetséges, $A_{2A}R$ szintet befolyásoló hatását is. Mind a természetes LXR ligand (22-(R)OH-koleszterol), mind a szintetikus PPAR δ agonista (GW501516) adása génszinten indukálta az $A_{2A}R$ -t a makrofágokban, tehát a két magreceptor valószínűleg szerepet játszik az $A_{2A}R$ szint szabályozásában. Az alkalmazott agonisták nem specifikus hatásainak kiküszöbölésének, illetve részvételük megerősítésének céljából LXR hiányos és PPAR δ knock out makrofágokban is megvizsgáltuk az apoptotikus sejtek $A_{2A}R$ expresszióra kifejtett hatását. Míg PPAR δ hiányában „eltűnt” az apoptotikus sejtek $A_{2A}R$ -t indukáló hatása, addig érdekes módon sem LXR $^{+/+}$ sem LXR $^{-/-}$ makrofágokban nem volt kimutatható az apoptotikus sejtek $A_{2A}R$ -t emelő hatása. Ez idáig nem sikerült magyarázatot találnunk a különböző egértörzsekből származó makrofágok eltérő viselkedésére. Ennek ellenére megállapíthatjuk, hogy a lipid-érzékelő magreceptorok részt vesznek az apoptotikus sejtek sejt felszíni $A_{2A}R$ -t emelő hatásában.

A_{2A} receptor hiányában megváltozik makrofágok apoptotikus sejtekre adott gyulladásos citokin termelése

Munkánk következő szakaszában azt vizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ hiányában változik-e makrofágok citokin profilja. Negyven citokin egyidejű, nagy érzékenységu meghatározásával (Proteome Profiler Mouse Cytokine Array) kimutattuk, hogy az $A_{2A}R$ hiánya nem befolyásolja jelentős mértékben a nyugalomban lévő makrofágok citokin termelését, apoptotikus sejteket felvevő makrofágokban viszont hatással van egyes citokinek szintjére.

Az $A_{2A}R^{+/+}$ makrofágok citokin profiljához képest kilenc citokin esetében találtunk szignifikánsan magasabb szintet az $A_{2A}R^{-/-}$ mintákban. A kemokinek és kemoattraktánsok közé tartozó IP-10, KC, MIP-1 α , MIP-1 β és MIP-2; gyulladásos citokinek közül az IL-17 és IL-1 α ; a hematopoetikus kolónia stimuláló faktor IL-3, valamint a gyulladáscsökkentő hatású IL-1 receptor antagonista (IL-1ra). A kilenc, $A_{2A}R$ hiányos makrofágok által túltermelt citokin közül a főként neutrofilekre ható MIP-2 és a KC kemoattraktánsok szintje mutatta a legnagyobb eltérést. Mivel az $A_{2A}R^{+/+}$ és az $A_{2A}R^{-/-}$ makrofágok nagyjából azonos fagocitotikus aktivitással és kapacitással rendelkeznek, ezért a citokin profilban tapasztalt eltéréseket nem az apoptotikus sejtfelvétel defektusa okozza. Mivel az alkalmazott antitest array szemikvantitatív módszer, ezért a kapott eredmények megerősítéseként specifikus ELISA technikával is meghatároztuk a MIP-2 és KC termelés alakulását. A fehérjeszintek meghatározásával kapott eredményeink összhangban álltak a korábban feltártakkal.

Annak a kizárására, hogy a citokin profilokban talált eltéréseket az $A_{2A}R$ hiányos makrofágok esetleges differenciálódási zavarai okozzák, megismételtük a citokin profilra irányuló kísérleteket $A_{2A}R$ -specifikus agonista (CGS21680), illetve antagonista (SCH442416) jelenlétében. Vad típusú makrofágok esetében az antagonista hatására megjelent a MIP-2 és a KC túltermelése, agonista jelenlétében viszont mindkét kemoattraktáns termelése az eredeti szintek alá csökkent. $A_{2A}R$ hiányos sejtekben az agonista jelenléte nem okozott számottevő változást a citokin profilban.

Mivel korábbi tanulmányok igazolták, hogy az apoptotikus sejtek hosszú távú gyulladáscsökkentő hatását a TGF- β és az IL-10 közvetíti, kíváncsiak voltunk arra, hogy az $A_{2A}R$ hiánya hogyan befolyásolja e két gyulladáscsökkentő citokin makrofágok általi termelését. A hosszú távú (24 óras) kísérletekkel ellentétben, a mi rendszerünkben -mely az apoptotikus sejtekre adott rövid távú (6 órán belüli) válaszra fókuszál-, sem citokin array, sem ELISA technikával nem volt kimutatható az IL-10 termelése. Az aktív TGF- β bár kimutatható volt, mégsem mutatott eltérő szintet az $A_{2A}R^{+/+}$ és $A_{2A}R^{-/-}$ mintákban. Ezáltal kizártuk annak a lehetőségét, hogy az IL-10 vagy TGF- β megváltozott mennyisége vezet az $A_{2A}R$ hiányos makrofágok fokozott kemoattraktáns termeléséhez.

Apoptotikus sejtek jelenlétében az A_{2A} receptor hiányos makrofágok neutrofil migrációt váltanak ki *in vivo*

Az *ex vivo* kísérletek után *in vivo* is teszteltük az $A_{2A}R$ apoptotikus sejtfelvétel során tapasztalt MIP-2 és KC termelését csökkentő hatását, illetve annak biológiai jelentőségét. A vizsgálathoz steril peritonitis modellt használtunk, mely során $A_{2A}R^{+/+}$ és $A_{2A}R^{-/-}$ egerekben intraperitoneális tioglikolát oltással steril gyulladást idéztünk elő, majd négy nap elteltével a gyulladás helyére

apoptotikus sejteket injektáltunk. Az apoptotikus sejtek adása $A_{2A}R^{+/+}$ egerekben nem vezetett számottevő neutrofil migrációhoz, $A_{2A}R^{-/-}$ egerekben viszont fokozott neutrofil bevándorlást eredményezett, ami összhangban állt a peritoneális folyadék magas MIP-2 és KC tartalmával. A fokozott neutrofil immigráció és a magas kemoattraktáns szint közötti összefüggés alátámasztása-ként modellünket módosítottuk: a tioglikolát-kezelt egerekbe az apoptotikus sejtekkel egyidejűleg MIP-2-t, illetve KC-t blokkoló antitest(eket), valamint megfelelő izotípus kontrollokat is beadunk. Az izotípus kontrollok a vártak megfelelően hatástalannak bizonyultak. A MIP-2 blokkolása önmagában csak részben akadályozta meg a neutrofilek bevándorlását, míg a két neutralizáló antitest egyidejű használata teljes mértékben kivédte azt. Modellünk ezáltal bebizonyította azt, hogy az apoptotikus sejteket felvevő $A_{2A}R^{-/-}$ makrofágok MIP-2 és KC túltermelése fokozott neutrofil bevándorlás okoz *in vivo*.

Az A_{2A} receptor hiányos makrofágok apoptotikus sejtekre adott fokozott MIP-2 választ egy, a nitrogén-monoxid termelés szabályozásáért felelős protein kináz A jelátviteli út zavara okozza

A munkák további részében magyarázatot kívántunk adni az $A_{2A}R$ hiányában fellépő fokozott MIP-2 kibocsátásra. Első lépésként megvizsgáltuk, hogy az $A_{2A}R$ hiánya milyen szabályozási szinten módosítja az apoptotikus sejtekkel kezelt makrofágok MIP-2 termelését. Mivel az $A_{2A}R$ legtöbb gyulladáscsökkentő hatását az adenilát cikláz/protein kináz A (PKA) jelátviteli út közvetíti, ezért elsőként ennek a szabályozási útnak a részvételét teszteltük. Egyik oldalról az $A_{2A}R$ stimulációt mimikálva különféle kémiai ágensek (kolera toxin; forskolin, dibutilil-cAMP) hozzáadásával növeltük az adenilát cikláz/PKA rendszer tónusát $A_{2A}R^{-/-}$ makrofágokban; másrészt $A_{2A}R^{+/+}$ sejtekben PKA inhibitorral (Rp-cAMP trietilamin) gátoltuk azt. Apoptotikus sejtfevételt során az adenilát cikláz/PKA rendszer aktivációja védelmet nyújtott a MIP-2 túltermelés ellen $A_{2A}R$ hiányos makrofágokban, míg a PKA gátlása fokozott MIP-2 termelést okozott a vad típusú sejtekben. Az ADO makrofágok környezetéből történő eltávolítása (enzimatisuk degradáció adenosin deaminázsal) ugyancsak a MIP-2 kibocsátás fokozódásához vezetett $A_{2A}R^{+/+}$ makrofágokban. Emellett a transzkripció és a transláció gátlásával (Actinomycin D, illetve cikloheximid kezelés) kivédhető volt az apoptotikus sejtfevétel MIP-2-t indukáló hatása, ami azt mutatja, hogy az apoptotikus sejtek fagocitózisa transzkripciós szinten szabályozza a makrofágok MIP-2 termelését. A makrofágokból apoptotikus sejtek hatására felszabaduló ADO tehát autokrin/parakrin módon hatva az adenilát cikláz/PKA jelátviteli út aktivációján keresztül tartja gátlás alatt a MIP-2 *de novo* szintézisét makrofágokban.

Irodalmi adatok szerint az apoptotikus sejteknek kitett makrofágok nitrogén-monoxidot (NO) bocsátanak ki, mely koncentrációfüggő módon befolyásolja a makrofágok MIP-2 termelését. Ezért további kísérleteinkben az ADO/A_{2A}R rendszer és a NO termelést közötti lehetséges kapcsolat, valamint a NO apoptotikus sejtfelevétel során játszott potenciális, MIP-2 termelést befolyásoló szerepének tisztázását tűztük ki célul. A NO termelésért felelős nitrogén-monoxid szintetázok (NOS) nem specifikus inhibitorral (L-nitro-arginin-metil-észter) történő gátlása csökkentette a MIP-2 mRNS és fehérjeszintű expresszióját mind A_{2A}R^{+/+} mind A_{2A}R^{-/-} makrofágokban. Ezzel párhuzamosan, a külsőleg adott NO donor (Na-nitroprusszid) hatására megemelkedett NO szint fokozta az apoptotikus sejtekkel kezelt makrofágok MIP-2 termelését. A NO donor adása önmagában nem fokozta a MIP-2 szintet, tehát az indukcióhoz apoptotikus sejtek által hordozott jelek szükségesek. Emellett meghatároztuk az apoptotikus sejtekkel kezelt makrofágok NO kibocsátását is, mely A_{2A}R hiányában mintegy kétszeresére növekedett a vad típushoz képest. A MIP-2 indukciójához hasonlóan a PKA inhibitor Rp-cAMP adása A_{2A}R^{+/+} makrofágokban fokozott, míg az adenilát cikláz forskolinnal történő aktiválása A_{2A}R^{-/-} sejtekben csökkent NO termelést vont maga után. Az eddigi eredmények alapján megállapítottuk, hogy az ADO/A_{2A}R által aktivált adenilát cikláz/PKA jelátviteli útvonal a NO termelés szabályozásán keresztül befolyásolja az apoptotikus sejteket felvevő makrofágok *de novo* MIP-2 szintéziséhez.

Az iNOS és argináz II génexpressziójának megváltozása vezet az A_{2A} receptor hiányos makrofágok fokozott NO termeléséhez

A NO L-arginin és L-citrullin prekursorokból történő intracelluláris képződését NOS enzimek katalizálják, melyeknek három formája ismert: endotheliális (eNOS), neuronális (nNOS) és indukálható (iNOS). Ezek közül a legnagyobb kapacitással rendelkező iNOS gyulladásos stimulus hatására számos sejttypusban, köztük a makrofágokban is indukálódik.

A makrofágok L-arginin készletét a NOS-ok mellett arginázok is hasznosítják. Az arginázok az L-arginin hidrolízisést katalizálják, az enzimreakció végterméke pedig ornitin és urea. Két formájuk közül az I. típus (ArgI) a hepatocitákban található meg legnagyobb mennyiségben és az urea ciklusban vesz részt. A II. típus (ArgII) a vesékben és a prosztatában dominánál, és a prolin illetve poliamin szintézisében betöltött funkciója révén szerepet játszik a sejtproliferáció és a kollagén szintézis szabályozásában. Az NOS-k és az arginázok L-argininért való „versengése” folytán a NO termelést nagy mértékben befolyásolja a két enzimescsoport által befolyásolt metabolikus útvonalak közötti egyensúly.

A fentiek alapján úgy gondoltuk, hogy az apoptotikus sejtfelevétel a NOS-ok és az arginázok szabályozásán keresztül indukál NO kibocsátást makrofágokban, illetve hogy az A_{2A}R ebbe valamilyen szabályozási szinten beleszól. Mivel a NOS-ok közül a nNOS és az eNOS nem volt detektálható sem nyugvó, sem apoptotikus sejteket felvevő hasüregi makrofágokban, ezért a harmadik forma, az iNOS felelős az apoptotikus sejtek által indukált NO termelésért. Kísérleti rendszerünkben az ArgI mRNS szintjeit sem az apoptotikus sejtekkel való kezelés, sem az A_{2A}R hiánya nem befolyásolta. Nyugvó A_{2A}R hiányos makrofágokban az NO termeléssel összhangban magasabb iNOS mRNS szinteket detektáltunk, mint a vad típusú sejtekben. Apoptotikus sejtek hatására a vad típusú és a receptorhiányos makrofágokban is csökkent az iNOS génexpressziós szintje, az ArgII-é viszont fokozódott. Mindkét változás a poliamin szintézis irányába billenti a mérleg nyelvét. Viszont A_{2A}R hiányos makrofágokban mind az iNOS mRNS szintjének csökkenése, mind az ArgII indukciója elmaradt a vad típusú sejtekben tapasztaltakhoz képest, ezáltal az L-arginin felhasználás a NO termelés irányába tolódott el. Eredményeink szerint tehát az apoptotikus sejtfelevétel az arginin metabolizmust a poliaminok szintézisének irányába tolja el és ezzel csökkenti a makrofágok NO termelését. Ez a szabályozás azonban A_{2A}R hiányában elégtelen, ami fokozott NO kibocsátást eredményez.

Mint ahogy azt az előző fejezetben bemutattuk, az A_{2A}R-indukált adenilát cikláz útvonal negatívan befolyásolja a makrofágok NO termelését. Így felmerült bennünk az a kérdés, hogy vajon ez a PKA-függő szabályozás érinti-e az apoptotikus sejtek által befolyásolt iNOS és ArgII génexpressziós szintjét. Ennek megválaszolására a már alkalmazott kísérleti rendszert használtuk és azt találtuk, hogy A_{2A}R^{+/+} makrofágokban a PKA gátlása megnövelte az iNOS gén átírását, míg A_{2A}R^{-/-} sejtekben a az adenilát cikláz aktiválása csökkentette az iNOS transzkriptumok mennyiségét. Az ArgII esetében a kezelések ellentétes hatást váltottak ki.

5. MEGBESZÉLÉS

A gyulladás a nem specifikus immunrendszer káros stimulusokra, például fertőzésre, fizikai és kémiai sejtkárosodásra adott válaszában szerves része, szerepe pedig az ártalmas behatás megszüntetésére, azt követően pedig a károsodások felszámolására és a regenerációra irányul.

A gyulladás kiváltásáért a károsodott sejtekből felszabaduló kémiai anyagok felelősek, melyek a rezidens sejtekre – főként makrofágokra – hatva kiváltják azok gyulladásos választ. A gyulladás korai szakaszában felszabaduló kemokinek és kemoattraktánsok további fagocitákat mozgósítanak a gyulladás helyére. A bevándorolt sejtek populációjában a neutrofilek dominálnak, melyek már a gyulladás korai fázisában megjelennek a gyulladás helyén. A későbbiekben a szöveti makrofágok utánpótlását biztosítandó megindul a monociták migrációja is. A gyulladás centrumában a neutrofilek és makrofágok a nem csak a patogének és a sejtmaradványok eltakarításában vesznek részt, hanem citokin termelésük által a specifikus immunrendszer aktivációjában is. A további károsodások elkerülése végett a gyulladásokkeltő hatás megszűnését követően a gyulladásos folyamatot teljes mértékben fel kell számolni. Számos tanulmány igazolja, hogy már pár órával a gyulladásos válasz kezdete után megindul az azt felszámoló komplex biológiai program. A különböző szövetekben eltérő mechanizmusok vesznek részt a gyulladás terminációjában. Ezek közé tartozik a gyulladásos mediátorok rövid féléletideje; a gyulladásoscsökkentő mediátorok indukciója és kibocsátása; a gyulladásos citokinek termelésének gátlása; illetve a gyulladásos jelet közvetítő receptorok deszenzibilizációja. A gyulladásoscsökkenés fázisában leáll a neutrofilek bevándorlása, a gyulladásos fenotípusú neutrofilekben pedig beindul az apoptotikus sejthalál programja. Az elhalt neutrofilek makrofágok takarítják el, melyek eközben további gyulladásoscsökkentő és reparatív citokinek termelésével járulnak a gyulladás felszámolásához.

Jelen tanulmányunk során a TG2 gyulladásos választ befolyásoló potenciális szerepét vizsgáltuk makrofágokban. Azt találtuk, hogy TG2 hiányában a makrofágok fokozott gyulladásos citokin termeléssel reagálnak LPS adására. Számos tanulmány szerint mind LPS-kezelt, mind apoptotikus sejtekkel kapcsolatba került makrofágok esetében a gyulladásoscsökkentő TGF- β játszik kulcs szerepet a gyulladásos válasz fékentartásában és terminációjában. A TGF- β indukciója és gyulladásoscsökkentő hatása azonban csak késői gyulladásos válaszok mérséklésében játszik szerepet. Kísérleteinkben a TGF- β korai gyulladásos válasza kifejtett hatását vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy sem a vad típusú makrofágokból felszabaduló aktív TGF- β neutralizálása, sem a TG2 hiányos makrofágok fiziológias

TGF- β szintjének rekombináns TGF- β adásával történő visszaállítása nem befolyásolta számottevő mértékben a makrofágok LPS-indukálta IL-6 és TNF- α termelését. Ezek az eredmények kétségre vonják annak a lehetőségét, hogy az aktív TGF- β hiányára vezethető vissza a TG2^{-/-} makrofágokban tapasztalt fokozott gyulladásos válasz.

A TGF- β szerepének megkérdőjelezése mellett azt találtuk, hogy TG2 hiányában a makrofágok fokozott az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátviteli útvonal tónusa, mely egyrészt megnövekedett Src tirozin kináz aktivítást von maga után nyugvó makrofágokban, másrészt az Src foszforilációs állapotának befolyásolásán keresztül fokozott gyulladásos citokin termelést eredményez LPS-kezelt makrofágokban. Továbbá megfigyeltük, hogy a domináns kereszt kötő aktivitás helyett a TG2 guanin nukleotid kötő funkciója, valamint az enzim sejt felszíni jelenléte szükséges az ITG $\alpha_v\beta_3$ jelátvitelhez és a gyulladásos citokin termelés megfelelő szabályozásához. Korábbi tanulmányokkal összhangban ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a TG2 guanin nukleotid-kötött formája szerepet játszik az integrin jelátvitel szabályozásában.

TG2 hiányában tehát a makrofágok fokozott gyulladásos citokin termeléssel reagálhatnak minden olyan stimulusra, mely a NF- κ B aktivációját befolyásolja akár közvetve, akár közvetlenül. A TG2 hiányos makrofágok gyulladásos fenotípusa ezáltal hozzájárulhat a TG2 knock out egerekben megfigyelt autoimmun rendellenességek, valamint az atherosclerosis iránti fogékonyság kialakulásához. Meglepő módon a TG2 hiányos makrofágokban tapasztalt LPS iránti fokozott érzékenység ellenére LPS-kezelt egerekben a TG2 gén kiütése megakadályozta az endotoxikus sokk kialakulását *in vivo*. A két megfigyelés közötti ellentmondásra magyarázatot adhat az endotoxikus sokk patológiájának komplexitása, valamint a TG2 funkcióinak, intracelluláris lokalizációjának, szöveti expressziójának valamint sejt-specifikus hatásainak változatossága és összetettsége.

A gyulladás gátló citokinek közül hosszú évekig a TGF- β -nak tulajdonítottak meghatározó szerepet az LPS-indukálta gyulladásos válasz csökkentésében, valamint az apoptotikus sejtek gyulladás-csökkentő hatásában. Az elmúlt évtizedben azonban számos szolubilis molekuláról – így például az IL-10-ről, a szfingozin-1-foszfátról és a HMGB-1ről is kiderült, hogy a TGF- β mellett szintén részt vesznek az apoptotikus sejtek eltakarítását kísérő immun-suppresszióban. Endogén szolubilis gyulladás-csökkentő molekula lévén felvetettük az ADO lehetséges szerepét az apoptotikus sejtek immunmoduláló hatásában.

Az ADO/A_{2A}R rendszerre irányuló kísérleteinkkel bemutattuk, hogy apoptotikus sejtekkel kezelt makrofágok az A_{2A} receptoraltípus stimulációjához elegendő mennyiségű ADO-t bocsátanak ki,

valamint ezzel egyidejűleg *de novo* receptorszintézis indukcióján keresztül megemelik az $A_{2A}R$ sejtfelszíni mennyiségét. Ezáltal az ADO nemcsak parakrin, hanem autokrin módon is képes kifejteni gyulladáscsökkentő hatását. A megemelkedett intracelluláris cAMP szint fagocitózist gátló hatásának ellenére a Gs-kapcsolt $A_{2A}R$ hiánya nem vezetett csökkent fagocitotikus aktivitáshoz és kapacitáshoz makrofágokban.

Apoptótikus sejtfelevétel során $A_{2A}R$ hiányos makrofágokban néhány citokin, köztük legnagyobb mértékben a főként neutrofilekre ható kemoattraktáns, a MIP-2 és a KC kibocsátása megemelkedett a vad típushoz képest. A MIP-2 és a KC túltermelését $A_{2A}R$ -specifikus agonista és $A_{2A}R$ -specifikus antagonistá használatával is alátámasztottuk, ami azt bizonyítja, hogy a megváltozott citokin profil az $A_{2A}R$ által közvetített jelátviteli út hiányának, nem pedig $A_{2A}R$ hiányában esetlegesen megváltozott makrofág differenciáció következménye.

Eddig bemutatott eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a gyulladás felszámolása során az apoptótikus neutrofileket eltakarító makrofágok által kibocsátott ADO és az $A_{2A}R$ negatív feedback elemként szerepet játszhat a neutrofilek gyulladás centruma történő migrációjának szabályozásában. A gyulladás citokinek $A_{2A}R$ -t szenzitizáló képessége miatt úgy véljük, hogy az apoptótikus sejtfelevétel gyulladáscsökkentő hatását közvetítő ADO szerepe az *in vitro*, gyulladásmentes modellünkhöz képest még fokozottabb lehet gyulladásos körülmények között *in vivo*. Feltételezésünk bizonyításaként *in vivo* peritonitis modellben is bemutattuk az $A_{2A}R$ hiányos makrofágok apoptótikus sejtfelevétel hatására bekövetkező MIP-2 és KC túltermelését, valamint a megemelkedett MIP-2 és KC szint neutrofil migrációt fokozó hatását.

Következő lépésként az $A_{2A}R$ hiányos makrofágok fokozott MIP-2 termelését vizsgáltuk meg részletesebben. Korábbi tanulmányok szerint nemcsak apoptótikus sejtek, hanem meghatározott gyulladásos szituációban az $A_{2A}R$ aktiváció hatására is indukálódik a gyulladáscsökkentő IL-10. Ennek ellenére kísérleti rendszerünkben az IL-10 nem volt kimutatható mennyiségben jelen. Az apoptótikus sejteket felvevő makrofágok $A_{2A}R$ hiányában ehelyett részben NO-t kibocsátásával szabályozzák a MIP-2 génexpresszióját. Az $A_{2A}R$ hiányos makrofágok fokozott nyugalmi és apoptótikus sejtek által indukált NO termelésében az NO-t szintézisét végző iNOS megnövekedett szintje mellett az azonos szubsztrátért versengő – ezáltal az NO termelés ellenében ható – ArgII csökkent expressziója játszik szerepet. Mivel az iNOS önmagában is számos szignál által befolyásolt, több szinten szabályozott enzim, ezért az mRNS szintek önmagukban nem tükrözik a két enzim valós aktivitását, illetve azok egymáshoz viszonyított arányát. Az iNOS sokrétű szabályozását tükrözi, hogy míg a nyugvó makrofágokban is detektáltunk iNOS mRNS-t, addig NO kibocsátás csak apoptótikus sejtek adását

követően volt megfigyelhető. Ez egyben azt jelenti, hogy az apoptotikus sejtekkel kezelt makrofágok NO kibocsátásának előfeltétele egy, a makrofág-apoptotikus sejt interakció korai fázisában meginduló jelátviteli út aktivációja. Célunk ennek a jelátviteli útvonalnak a feltárása. Mivel mind vad típusú, mind A_{2A}R hiányos makrofágokban megfigyelhető az apoptotikus sejtek NO termelést indukáló hatása, ezért jelenleg úgy gondoljuk, az A_{2A}R ebben a szabályozó útvonalban nem játszik szerepet.

Ehelyett úgy véljük, hogy az A_{2A}R az iNOS és az ArgII közötti egyensúly beállításán és fenntartásán keresztül szabályozza a NO válasz mértékét. Hipotézisünket megerősíti egy korábbi tanulmány, mely szerint apoptotikus sejt felvételt követően az arginin anyagcsere a NO termelés helyett a poliamin szintézis irányába tolódik el. Érdekes módon az apoptotikus sejteket eltakarító makrofágokból felszabaduló gyulladáscsökkentő mediátorok –köztük a TGF- β is- PKA-függő módon, az argináz aktivitás fokozása által csökkenteni képesek a makrofágok NO termelését. Ezáltal PKA-mediált jelátviteli utat aktiváló TGF- β és A_{2A}R egymással párhuzamosan vagy egymást kiegészítve játszhat szerepet az apoptotikus sejtek arginin anyagcsérét módosító hatásában. Míg a TGF- β esetében részvételét korábban már igazolták, addig az ADO/ A_{2A}R rendszer NO termelést szabályozó szerepét tanulmányunk igazolja elsőként.

Összességében eredményeinkkel elsőként mutattuk be, hogy apoptotikus sejtekkel kapcsolatba került makrofágok az IL-10 és a TGF- β mellett ADO-t is kibocsátanak, mely gyulladáscsökkentő hatásán túl általános szabályozó szerepet tölt be a nem specifikus és az adaptív immunrendszer működésében egyaránt. Mivel felszabadulása nem korlátozódik egy adott apoptotikus sejt típusra, ezért gyulladáscsökkentő és immunmoduláló szerepe a szervezet minden olyan helyén érvényre juthat, ahol apoptózis zajlik.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A soksejtű szervezetek bakteriális és gombás fertőzésre a gyulladás komplex biológiai programával válaszolnak. A gyulladásos folyamat kezdeti szakaszában makrofágok és neutrofilek vándorolnak a gyulladás helyére, ahol a patogének eltakarítása mellett gyulladásos mediátorok kibocsátásán keresztül további fagocitákat mozgósítanak, illetve aktiválják az adaptív immunrendszer komponenseit. A gyulladás felszámolásának fázisában a makrofágok eltakarítják a gyulladásos reakciók során apoptózissal elhalt sejteket. Ez a folyamat a makrofágok fenotípusváltását idézi elő: a gyulladásos fenotípusból deaktivált állapotba történő átmenetük nagy mennyiségű gyulladásosokkentő és reparatív mediátor (pl. TGF- β) felszabadulását okozza.

Munkánk során bemutattuk, hogy szöveti transzglutamináz (TG2) hiányában a makrofágok fokozott IL-6 és TNF- α termeléssel reagálnak bakteriális LPS-re, tehát a TG2 valamilyen módon részt vesz a gyulladásos citokin termelés szabályozásában. Bár TG2 hiányában elégtelen a gyulladásos folyamatokban negatív feedback mediátorként részt vevő TGF- β termelése, a TG2 knock out makrofágok LPS-re adott fokozott gyulladásos válasza és az aktív TGF- β hiánya között nem találtunk összefüggést. TG2 hiányában viszont felerősödött integrin $\beta 3$ jelátvitel volt megfigyelhető, mely az Src tirozin kináz nyugalmi aktivitásának megemelésével fokozott I κ B α foszforilációt és degradációt eredményezett stimulálatlan makrofágokban. A csökkent I κ B α alapszint miatt a TG2 hiányos makrofágok túlérzékenyebbé válnak minden olyan gyulladásos stimulussal szemben, mely az NF- κ B aktiváción keresztül vált ki gyulladásos citokin termelést. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy TG2 hiányában a makrofágokat gyulladásos fenotípust mutatnak, ami a TG2 hiányos egerek autoimmun betegségek és atherosclerosis iránti fogékonyságát eredményezheti *in vivo*.

A fentiek mellett vizsgálatainkkal azt is bemutattuk, hogy az apoptotikus sejteket eltakarító makrofágok a TGF- β mellett adenozint is kibocsátanak, mégpedig olyan mennyiségben, mely a négy adenozin receptor közül a főként gyulladásosokkentő jelet közvetítő adenozin A_{2A} receptor (A_{2A}R) aktivációját eredményezi. Ezzel párhuzamosan a fagocitált apoptotikus sejtek lebontása során felszabaduló intracelluláris lipidek az LXR és a PPAR δ aktiválásán keresztül megemelik az A_{2A}R sejtfelszíni expresszióját. Az A_{2A}R stimuláció hatására a makrofágokban aktiválódik az adenilát cikláz/protein kináz A jelátviteli út, mely folyamatos gátlás alatt tartja a MIP-2 neutrofil kemoattraktáns indukáló nitrogén-monoxid (NO) termelését. Ezért A_{2A}R hiányos makrofágokban az apoptotikus sejtek felvétele fokozott NO és MIP-2 kibocsátást okoz, mely *in vivo* peritonitis modelünk alapján felerősödött neutrofil bevándorlást eredményez a gyulladás helyére.

Jelen munkánk összességében azt bizonyítja, hogy az adenosin egyike a makrofágokból apoptótikus sejtfevétel során felszabaduló gyulladáscsökkentő anyagoknak, a TG2 pedig a látens TGF- β aktivációjában betöltött szerepén túl az integrin jelátvitel szabályozásán keresztül is kifejtí gyulladáscsökkentő hatását.

7. PUBLIKÁCIÓK

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KONFERENCIA PREZENTÁCIÓK

ANGOL NYELVŰ ELŐADÁS:

Köröskényi K. **Inhibition of proinflammatory cytokine production of macrophages by apoptotic cells.** 1st Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Krompachy, Szlovákia; 2008 Január 08-11

Köröskényi K. **Adenosine is a soluble mediator of immune down-regulation induced by apoptotic cells.** 2nd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Krompachy, Szlovákia; 2009 Január 06-09

Köröskényi K. **Adenosine is a soluble mediator to regulate part of the anti-inflammatory responses induced in macrophages by apoptotic cells.** 3rd Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Mariazell, Ausztria; 2010 Január 07-10

Köröskényi K. **Involvement of adenosine A_{2A} receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation.** (in English) 4th Molecular Cell and Immune Biology (MCIB) Winter School, Galyatető; Január 11-14

MAGYAR NYELVŰ ELŐADÁS:

Köröskényi K. **Az adenozin a makrofágok A_{2A} receptorain keresztül hatva hozzájárul az apoptotikus sejtfehérje gyulladáscsökkentő hatásához és így a gyulladásos reakció terminálásához** Magyar Immunológiai Társaság 2009. Évi Vándorgyűlése, Harkány; 2009. Október 29–30

POSZTEREK:

Tóth B, Sarang Z, Köröskényi K., Garabuczi E, Aeschlimann D, Vereb G, Fésüs L, Szondy Z: **Roles of tissue transglutaminase in the phagocytosis of apoptotic cells.** 5th Euroconference on Apoptosis, Portoroz, Szlovénia; 2007 Október 26-31

Köröskényi K, Sarang Z, Duró E, Fésüs L, Szondy Z: **Adenosine A_{2A} receptors mediate the anti-inflammatory phenotype of macrophages exposed to apoptotic cells.** 16th Euroconference on Apoptosis, Bern, Svájc; 2008 Szeptember 06-09

Köröskényi K, Sarang Z, Fésüs L, Szondy Z: **Az apoptotikus sejtek gyulladásási citokin termelést szabályozó hatásának vizsgálata vad típusú és szöveti transzzglutamináz (TG2) hiányos makrofágokban.** Magyar Biokémiai Társaság 2006. Évi Vándorgyűlése, Pécs; 2006. Augusztus 30–Szeptember 02

Köröskényi K, Sarang Zs, Fésüs L, Szondy Zs: **A szöveti transzzglutamináz hatása a makrofágok gyulladásási citokintermelésére.** Magyar Biokémiai Társaság 2007. Évi Vándorgyűlése, Debrecen; 2007. Augusztus 26–29

Köröskényi K, Sarang Z, Duró E, Fésüs L, Szondy Z: **Adenosine A_{2A} receptors mediate partially the anti-inflammatory phenotype of macrophages exposed to apoptotic cells.** Magyar Biokémiai Társaság 2008. Évi Vándorgyűlése, Szeged; 2008 Augusztus 31–Szeptember 03

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

Köröskényi K, Sándor K, Sarang Zs, Szondy Zs: **Az adenosin A_{2A} receptor szerepe az apoptotikus sejt felvétel gyulladásosokkentangató hatásában.** Magyar Biokémiai Társaság 2010. Évi Vándorgyűlése, Budapest; Augusztus 25-28 / Magyar Immunológiai Társaság 2010. Évi Vándorgyűlése, Szeged; 2010 November 03–05

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, Lewiston, USA; 2011 Július 17-22



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/204/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Köröskényi Krisztina

Neptun kód: NSPXVL

Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Köröskényi, 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:5.745 (2010)
2. Sarang, Z., Köröskényi, 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 $\alpha(v)\beta(3)$ 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:2.511 (2010)

További Közlemények

3. Sarang, Z., Tóth, B., Balajthy, Z., Köröskényi, K., Garabuczi, É., Fésüs, L., Szondy, Z.: Some lessons from the tissue transglutaminase knockout mouse. *Amino Acids.* 36 (4), 625-631, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00725-008-0130-x>
IF:3.877

