

Zárójelentés

„Az apoptotikus sejtek fagocitózisa és gyulladásai folyamatok kapcsolata” című OTKA pályázat keretében 2007 júliusa és 2010 júniusa között végzett kutatómunka eredményeiről.

Célkitűzés

Ismert, hogy míg testidegen mikroorganizmusok fagocitózisa gyulladásai citokinek termelődésével jár együtt, az apoptotikus sejtek eltakarítását nem kíséri gyulladás. Az apoptotikus sejtek esetében a gyulladásai citokinek termelődése nem egyszerűen elmarad, hanem egy aktív gyulladásellenes folyamat eredménye. Az apoptotikus sejtek gátolják pl. a bakteriális eredetű lipopoliszachariddal (LPS) kiváltott gyulladásai citokin termelést is. A gyulladás gátlásában a foszfatidilszerin receptorok játszanak szerepet és aktív TGF β termelődése is hozzájárulhat. Kutatócsoportunkban korábban kimutattuk, hogy a szöveti transzglutamináz (TG2) makrofágokban (M Φ) elősegíti az apoptotikus sejtek felvételét (1) és TG2 hiányában, az apoptotikus gyulladásai sejtek megjelenése kíséri *in vivo*, valamint az egerekben glomerulonefritisszel, lépmeagnagyobbodással és megnövekedett plazma anti-nukleáris antitest szinttel jellemzett autoimmun betegség alakul ki (2). Jelen kísérleteinkben vizsgálni kívántuk, hogy apoptotikus sejt fagocitózisa során hogyan történik a gyulladásai folyamat gátlása és a TG2 hiánya befolyásolja-e a M Φ -ok azon képességét, hogy apoptotikus sejt felvétele során csökkentik a gyulladásai citokin termelésüket.

Eredmények

1. A TG2 és fagocitózis kapcsolatának vizsgálata.

Korábban leírtuk, hogy a TG2 hiánya a fagocitózis zavarához vezet M Φ -okban (1). Nem ismert viszont, hogy a TG2 szint emelése milyen hatással van a fagocitózisra. A M Φ -okat interferon-gammával (IFN γ) klasszikusan aktivált, interleukin 4 (IL-4) kezeléssel alternatívan aktivált M Φ -gá lehet polarizálni. Az interferon gammáról leírták, hogy humán monocitákban megemeli a TG2 szintjét. Az IL-4 szerepe kérdéses a TG2 szabályozásában: egyes irodalmi adatok szerint megemeli TG2 szintjét, más adatok szerint nem. A transz-retinsavról (ATRA) ismert, hogy megnöveli a TG2 mennyiségét a M Φ -okban, így azt kontroll kezelésként használtuk. Azt találtuk, hogy az *in vitro* IL-4 nem befolyásolja a sejtek TG2 szintjét, ugyanakkor az IFN γ és ATRA kezelés megemelte azt. Egér M Φ -okban azonban csak

az ATRA kezelés eredményezett fagocitózis növekedést. Ugyanakkor ez függetlennek tűnik a TG2-től, mivel ez a hatása megtalálható volt TG2 hiányos MΦ-okban is. Kísérleteinkből arra következünk, hogy míg a TG2 teljes hiánya negatívan befolyásolja a fagocitózist (korábbi adataink(1)), addig a már meglévő TG2 szint emelése IFN γ -val és ATRA-val nem jár további fagocitózis emelkedéssel. Az ATRA kezelés a feltételezhetően elősegíti a csontvelői progenitorok differenciálódását ezért kvantitatív PCR-ral meghatároztuk számos fagocitózisban szerepet játszó molekula expresszióját kontroll és ATRA kezelt MΦ-okban. Eredményeink az mutatják, hogy ATRA kezelés hatására számos integrin receptor expressziója csökkent, míg a CD14 receptor, ABCA1 transzporter és az apoptotikus sejt és makrofág közötti hídképző trombospondin szintje megnőtt.

2. TG2 szerepe a gyulladás szabályozásában apoptotikus sejt fagocitózisa során.

Kísérleteinkben vad típusú és TG2 hiányos egerekből izoláltunk hasüregi MΦ-t mint fagociták és timocitákat mint apoptotikus sejteket használtunk. Kimutattuk, hogy a TG2 hiánya nem befolyásolta a MΦ-ok azon képességét, hogy apoptotikus sejttel kapcsolatba kerülve csökkentsék az LPS indukált gyulladási citokin termelésüket. A gyulladási citokin csökkentő hatás vad típusú MΦ-ban igen, de TG2 hiányosokban nem volt kiváltható olyan makrofágok felülűszójával, amelyeket előzetesen apoptotikus sejteknek tettünk ki, feltételezve szolúbilis szabályozó molekulák felszabadulást a MΦ-ból. Mint lehetséges résztvevő, felmerült az adenzin szerepe a gátlás kialakulásában, mivel az adenzin egy endogén gyulladáscsökkentő vegyület.

3. Apoptotikus sejt fagocitózisa során felszabaduló adenzin gyulladás szabályozó szerepe

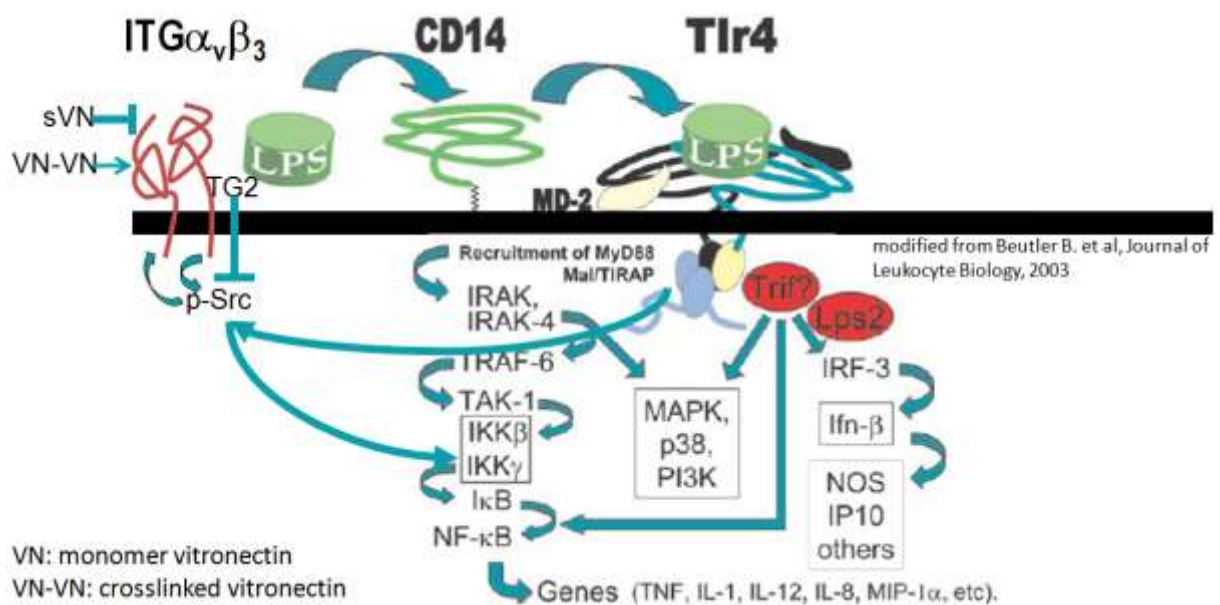
Az adenzin receptorai (A1, A2A, A2B, A3) megtalálhatóak a MΦ-on is. A négy receptoraltípus közül az A2A receptor játszik legnagyobb szerepet a gyulladási folyamatok gátlásában. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy az A2A receptor hiánya befolyásolja-e az apoptotikus sejtek gyulladásgátló képességét egér MΦ-ban. Azt találtuk, hogy az A2A receptor hiányában az LPS indukált TNF- α és IL-6 termelés a vad típusú sejtekhez hasonlóan csökkent apoptotikus sejt jelenlétében, azaz az A2A receptor nem befolyásolta a MΦ azon képességét, hogy apoptotikus sejttel kapcsolatba kerülve csökkentsék az LPS indukált

gyulladásai citokin termelésüket. Ezzel szemben ha apoptotikus sejtet fagocitáló MΦ kondicionált felülúszójával próbáltuk csökkenteni más MΦ-ok LPS indukált gyulladásai citokin termelését azt találtuk, hogy az IL-6 citokin és a MIP-2 kemokin termelés gátlása szelektíven az A2A receptoron keresztül történik. Ezen túl, A2A receptor hiányos MΦ-ok apoptotikus sejt fagocitózisa során többet termeltek a neutrofilekre ható MIP-2 és KC kemoattraktánsakból mint a vad típusú sejtek. Ennek megfelelően, apoptotikus sejtek hasüregbe való injektálása fokozott hasüregi neutrofil bevándorlást eredményezett a receptorhiányos egerekben *in vivo*. Ismert, hogy az apoptotikus sejtnél kitett MΦ-ok nitrogén-monoxidot (NO) szekretálnak, amely hozzájárul a MIP-2 termeléséhez ezért meghatároztuk a NO szintjét a két MΦ-ban. Azt találtuk, hogy A2A receptor knock-out (KO) MΦ-ok több NO-t termelnek, mint a vad típusú sejtek. Adataink azt mutatják, hogy az adenzin az apoptotikus sejteket fagocitáló makrofágok által kibocsátott egyik szolúbilis mediátor, mely egyik oldalról citokin-specifikus módon részt vesz a gyulladásai válasz lecsendesítésében, másrészt a MIP-2 szabályozásán keresztül szerepet játszik a további, neutrofilek által megvalósuló immunválaszok szükségességének eldöntésében. (Involvement of Adenosine A2A Receptors in Engulfment-Dependent Apoptotic Cell Suppression of Inflammation; Krisztina Köröskényi, Edina Dúró, Anna Pallai, Zsolt Sarang, Doris Kloor, David Ucker, Catherine A. Ledent, László Fésüs és Zsuzsa Szondy; kézirat beküldve a Journal of Immunology-hoz).

4. TG2 szerepe LPS indukált gyulladásban

Kutatócsoportunkban korábban kimutattuk, TG2 egerekben ólom-nitrát indukált máj apoptózis során nagyobb számban jelennek meg gyulladásai sejtek a májban, mint vad típusú egerekben. 2005-ben más munkacsoport azt találta, hogy TG2 hiányában megváltozik a MΦ-ok apoptotikus sejtre adott citokin válasza. Ugyanakkor nem vizsgálták a citokin választ gyulladás során. Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a TG2 KO MΦ-ok megnövekedett gyulladásai citokin termeléssel válaszolnak LPS kezelésre. Ennek hátterében nem a két sejt-típus által termelt eltérő aktív TGF-β szint áll. Különböző funkció hiányos TG2 mutánsokkal meghatároztuk, hogy a TG2 sejten kívüli jelenléte szükséges a gyulladásai citokin termelés csökkentéséhez KO sejtekben. A TG2 extracellulárisan a β3 integrin koreceptoraként funkcionál és képes gátolni az Src kináz aktivitását. TG2 hiányos MΦ-okban fokozott az integrin β3 kifejeződése (3) és ez valamint a TG2 okozta gátlás hiánya, fokozott Src aktivitást tart fenn (ez pedig, ahogy kimutattuk, tovább fokozza az integrin β3

foszforolódását és aktivitását), amely az foszforilálja és ezáltal aktiválja az inhibitor kappa B kinázt (IKK). Az IKK foszforilálja az NF- κ B aktiválódást gátló inhibitorikus I κ B-t, ami így lebomlik és több NF- κ B p65 alegység transzlokációját eredményezi a sejtmagba. Ennek következtében TG2 hiányos M Φ -ban alapállapotban is nagyobb mennyiségű NF- κ B alegységek mutathatók ki a sejtmagban, ami magyarázza a fokozott NF- κ B függő gyulladási citokin termelő képességüket. KO M Φ -ban az integrin receptor gátló szolubilis vitronektinnel vagy az Src kináz gátló PP2-vel hatékonyan lehetett gátolni az LPS indukált IL-6 és TNF- α termelődését. (Transglutaminase 2 Null Macrophages Respond to Lipopolysaccharide Stimulation by Elevated Proinflammatory Cytokine Production due to an Enhanced α v β 3 Integrin-induced Src Tyrosine Kinase Signaling; Zsolt Sarang, Krisztina Köröskényi, Anna Pallai, Edina Duró, Gerry Melino, Martin Griffin³, László Fésüs and Zsuzsa Szondy; kézirat beküldve az European Journal of Immunology-hoz)



Párbeszéd az LPS és β 3 integrin jelátviteli utak között

5. TG2 szerepe a látens TGF- β aktiválásában

Ismert, hogy a TGF- β látens állapotban szekretálódik és aktiválódásához a kötőszöveti mátrixhoz való kikötődés és a látencia asszociált fehérje valamint a látens TGF- β kötő fehérje lehasítása szükséges. Ebben a folyamatban a trombin és plazmin proteázok valamint a TG2 vesznek részt. Kísérleteinkben LPS-el és apoptotikus sejteket mimikáló latex gyöngyökkel

kezelt vad típusú és TG2 KO MΦ-ban határoztuk meg a plazmin aktivitását kazein gél zimográfiával és kromogén szubsztrát hasítás segítségével, de nem találtunk eltérést a két sejttípus között. Szintén nem találtunk eltérést a két sejttípus között az aktív TGF-β termelés gátlásában, ha a sejteket aprotinin vagy leupeptin proteáz inhibitorokkal kezeltük elő. A kísérletek negatív kimenetele után Garabuczi Éva PhD hallgató új témát kezdett, melynek keretében a TG2 indukciójának szabályozását vizsgálja timocitákban.

6. TG2 szerepe az apopto-fagocitózis programban és a szöveti integritás biztosításában

A TG2 egy olyan multifunkcionális fehérje, amely számos ponton beleszól a sejtek apoptózis és fagocitózis programjába, és ezek mindegyike azt a célt szolgálja, hogy az elhalást ne kísérje gyulladás vagy szöveti roncsolódás. Az elhaló sejtekben segíti a döntési folyamatot, s a potenciálisan veszélyes sejt elhalását gyorsítja, a makrofágok számára „find me” szignált készít, az apoptotikus sejt fehérjéinek keresztbe kötésével gátolja a káros sejttartalom kijutását, ugyanakkor fokozza a fagocitózist elősegítő foszfatidilszerin megjelenését (4). A makrofág oldalon hozzájárul a hatékony fagocitózishoz és a gyulladás csökkentéséhez. Ezeket a megfigyeléseinket egy review közleményünkben foglaltuk össze (5).

Hivatkozások

1. Tóth B, Garabuczi E, Sarang Z, Vereb G, Vámosi G, Aeschlimann D, Blaskó B, Bécsi B, Erdődi F, Lacy-Hulbert A, Zhang A, Falasca L, Birge RB, Balajthy Z, Melino G, Fésüs L, Szondy Z Transglutaminase 2 Is Needed for the Formation of an Efficient Phagocyte Portal in Macrophages Engulfing Apoptotic Cells JOURNAL OF IMMUNOLOGY Volume: 182 Issue: 4 Pages: 2084-2092 IF: 6.068
2. Z. Szondy, Z. Sarang, P. Molnár, T. Németh, M. Piacentini, P.G. Mastroberardino, L. Falasca, D Aeschlimann, E. Szegezdi, G. Lakos, J. Kovács, E. Rajnavölgyi, P. J. Birckbichler, G. Melino, L. Fésüs (2003) TGASE2^{-/-} mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7812-7 IF: 10.789
3. Tóth B, Sarang Z, Vereb G, Zhang A, Tanaka S, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. Over-expression of integrin beta3 can partially overcome the defect of integrin beta3 signaling in transglutaminase 2 null macrophages Immunol Lett. 2009 Sep 22;126(1-2):22-8. IF: 2.63

4. Sarang Z, Mádi A, Koy C, Varga S, Glocker MO, Ucker DS, Kuchay S, Chishti A, Melino G, Fésüs L, Szondy Z. 2007. Tissue transglutaminase (TG2) facilitates phosphatidylserine exposure and calpain activity in calcium-induced death of erythrocytes. *Cell Death Differ.* 14: 1842-1844. IF:8.254

5. Sarang Z, Tóth B, Fésüs L, Szondy Z (2009) Some lessons from the tissue transglutaminase knock out mouse. *Amino Acids* 36:625-631. IF: 2.858