

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Apoptotikus és nem apoptotikus sejthalál folyamatok
szerepe az immunválasz szabályozásában

Dr. Koncz Gábor



DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
IMMUNOLÓGIAI INTÉZET
Debrecen, 2024

Tartalom

| | |
|---|----|
| BEVEZETÉS:..... | 3 |
| A Fas receptor által indukált sejthalál: | 3 |
| Az aktiváció indukált sejthalál | 4 |
| A B sejtek szelekciója a germinális centrumokban:..... | 5 |
| A sejthalál folyamatok immunológiai kimenete, az immunogén sejthalál | 6 |
| EREDMÉNYEK: | 7 |
| A BCR aktiváció a Gab2 adapter foszforilációján keresztül az érett B sejtek túlélését eredményezi..... | 7 |
| A TLR9 és BAFF indukált túlélő szignálok vizsgálata B sejtekben | 8 |
| Az SHP1 foszfatáz szerepe a Fas mediált jelátvitel szabályozásában ... | 9 |
| Az immunválaszban zajló citotoxikus mechanizmusok vizsgálata..... | 10 |
| Az éretlen aktivált dendritikus sejtek felülűszója RIPK1-függő sejthalált indukál | 12 |
| A mintázatfelismerő receptorok hatása a sejthalál és túlélő szignálokra, a flagellin fokozza a Fas indukált sejthalált | 12 |
| A kaszpáz-9 szabályozza a nekroptotikus sejthalált | 13 |
| Az antiinflammatorikus és a proinflammatorikus makrofágok makrofágok sejthalál érzékenysége eltérő..... | 14 |
| Legfontosabb új eredmények: | 16 |
| A tézisek a következő saját közleményeken alapulnak | 20 |
| Tudományometriai adatok:..... | 23 |

BEVEZETÉS:

A többsejtű élőlények bármely sejtje elpusztulhat a szervezet homeosztázisának fenntartása érdekében. A sejthalál programok sérülése tumorok és egyes autoimmun kórképekben megfigyelhető is. A túlzott intenzitású sejthalál ugyanakkor degeneratív betegségek, agyi traumák, mint a Parkinson kór, az Alzheimer vagy Huntington betegség, retina leválás, iszkémia reperfüzió előidézője lehet. Az immunrendszerben zajló, az immunrendszer különböző sejtpopulációira ható sejthalál folyamatok a természetes és az adaptív immunrendszer működésére is jelentős hatást gyakorolhatnak, megváltoztathatják az immunválasz intenzitását, polarizációját.

Az elmúlt évek eredményei alapján világossá vált, hogy nemcsak a sejthalál intenzitásának, hanem immunológia kimenetének pontos szabályozása is létfontosságú a szervezet szempontjából. Az elmúlt évtizedekben számos sejthalál formát írtak le, így az apoptózis mellett több olyan sejthalál vált ismertté, amely szabályozott folyamat, de a membránintegritás elvesztésével, ennek következtében DAMP felszabadulással és gyulladás indukcióval jár. A sejthalál immunológiai pro-, vagy antiinflammatorikus tolerogén/immunogén kimenete meghatározhatja az immunválasz további lépéseit.

A Fas receptor által indukált sejthalál:

A sejthalál receptorok aggregációja lehetővé teszi a FADD adapter molekula asszociációját a receptorokhoz, amit a kaszpáz-8 toborzása, majd oligomerizációja követ. A nagyméretű molekula komplexek kialakulása lehetővé teszi, hogy az iniciátor kaszpázok transz-autoproteolízissel aktiválódjanak, ami beindítja az apoptotikus kaszkádot. A Fas receptor aggregációját, annak membrán raft lokalizációja, majd a receptor komplex internalizációja követi.

Amennyiben ezek a lépések gátoltak, nem alakul ki apoptózis. Míg a sejthalál kialakító jelátviteli lépésekről egyre több adat áll rendelkezésre, az ezt gátló mechanizmusok pontos működése kevésbé ismert, különösen a jelpálya kezdeti szakaszán. Az immunválasz során a Fas indukált apoptózis szerepet játszik a fertőzött sejtek, tumorok elpusztításban, de nélkülözhetetlen az autoreaktív T és B sejtek elpusztításában is, ezáltal a Fas-indukált sejthalál megismerése az immunológiai tolerancia szabályozásának is új lehetőségét jelenti. Működőképes Fas/FasL hiányában az egerek széruma emelkedett T sejt számot, fokozott ellenanyag és autoantitest termelést mutat, míg emberben a hasonló karakterisztikájú autoimmun limfoproliferatív kórkép alakul ki.

Az aktiváció indukált sejthalál

Az aktiváció indukált sejthalál az antigén eltávolítását követően feleslegessé váló T sejtek eliminációjával biztosítja a tolerancia fenntartását. Eredetileg Fas függő folyamatként írták le, de ismert, hogy FADD és caspase-8 hiányban is lezajlik, így Fas független mechanizmusok is szerepet játszanak a folyamatban. A sejthalál ligandumok sejt felszíni megjelenését követően membrán kötött formában, sejt-sejt kontaktus útján is előidézhetik a sejthalált, de az ultracentrifugálással nyerhető szekretált vezikulumok felszínén is kimutattak FasL, TRAIL és TNF expressziót. A vezikula kötött FasL a Fas receptorok oligomerizációját váltja ki és ezen keresztül képes apoptózist előidézni, míg a szolubilis FasL monomer formája elsősorban a sejthalál kompetitív inhibitora, mivel gátolja a receptor aggregációját.

Apoptózis inhibitorokkal nem lehet teljes mértékben megakadályozni az AICD-t, ami arra utal, hogy az apoptotikus jelpályák mellett, eddig nem pontosan ismert, nem apoptotikus sejthalál mechanizmusok is részt vesznek az AICD mechanizmusában.

A B sejtek szelekciója a germinális centrumokban:

A B sejtek az antigén felismerését követően a germinális centrumokban szelektálódnak, majd ezt követően a nagy affinitású B sejtek proliferálódnak. A szelekció során az egyes sejtek versengenek az antigénért és míg a legnagyobb affinitású sejtek a túlélő szignálok hatására tovább lépnek a folyamatban, az antigénért zajló kompetícióban alulmaradó sejtek nem képesek az antigént megkötni, internalizálni és prezentálni a helper T sejteknek, így apoptózissal elpusztulnak. A túlélő szignálok megszerzéséért zajló versengés egyúttal nélkülözhetetlen az autoreaktív B sejt klónok eliminálásában is. A nem specifikus vagy autoreaktív B sejtek számára a legfontosabb sejthalál szignált a Fas receptor aktivációja okozza. Az antigén specifikus sejtek túlélését elsősorban a B sejt receptoron keresztül érkező stimulusk biztosítják, de emellett a folliculáris dendritikus sejtek, és folliculáris helper T sejteken megjelenő receptorok (CD40, ICOS) és a termelt citokinek (IL4, IL21) is elősegítik az antigénnel szoros kapcsolatba kerülő B sejtek életben maradását. Az immunválasz egyes szakaszaiban (antigén túlsúly) több B sejtre lehet szükség, ilyenkor az alacsonyabb specificitású B sejtek is túlélhetnek, míg az immunválasz késő szakaszában (csökkenő antigén mennyiség) már csak az egyre nagyobb affinitású sejtek életben maradása, memória sejtje differenciálódása a cél. A természetes immunrendszer felismerő mechanizmusai is befolyásolhatják a germinális centrumban zajló szelekciós folyamatok küszöbértékét, segítve, hogy jelentősebb antigén mennyiség intenzívebb B sejt válasz alakuljon ki. Összességében a sejthalál, a B sejt receptor közvetített és a nem antitagspecifikus túlélő jelek egyensúlya sokrétűen szabályozott.

A sejthalál folyamatok immunológiai kimenete, az immunogén sejthalál

Az utolsó néhány évben több az apoptózistól független, szabályozott, sejthalál útvonalat is leírtak. Ezek többsége a membránintegritás elvesztésével, ennek következtében DAMP felszabadulással és gyulladás indukcióval jár. Az immunválasz során a sejthalál vagy mintázatfelismerő receptorok a sejtek többségén apoptózist - ezen belül a klasszikus FADD-kaspáz-8 indukált, illetve RIPK1 függő apoptózist, - a kaspáz-1 mediált piroptózist és a RIPK1-RIPK3 függő nekroptózist egyaránt aktiválhatják. Az apoptózis alapvetően tolerogén sejthalál, mivel a szomszédos vagy fagocita sejtek maradék nélkül bekebelezhetik az apoptózissal elhalt sejteket, így a folyamat során nem képződnek veszély szignálok. A piroptózis során a sejt belsejéből veszély jelek szabadulnak fel, ráadásul aktív IL-1 is termelődik így ez a sejthalál forma erős gyulladásos reakciókhoz vezet. A nekroptózis során szintén kialakulnak veszély szignálok, de a RIPK1 függő sejthalál formák egyidejűleg a T sejtek aktivációját, azaz az adaptív immunválasz kialakulását is elősegítik, immunogén sejthalált indukálva. A denritikus sejtekről (DC) ismert, hogy folyamatosan fagocitálják a pusztult sejteket, és ezt követően képesek a fertőzött, vagy tumorsejtekből származó antigén fragmenseket keresztprezentációval bemutatni, ezáltal lehetővé válik a naiv CD8+ T sejtek aktiválása. A RIPK1-függő sejthalál folyamatok elősegítik, hogy a pusztult sejtekből származó, fagocitált fehérjék peptidjei MHC I molekulákon keresztül is prezentálódjanak. A sejthalál útvonalak immunológiai kimenetének (tolerogén, inflammatórikus, immunogén) befolyásolása jelentős klinikai haszonnal járhat a gyulladásos folyamatok szövet destrukciójának csökkentésében, az immunrendszer tumorok elleni aktivációjában, a neurodegeneratív betegségek vagy a tumorok kezelésében.

EREDMÉNYEK:

A BCR aktiváció a Gab2 adapter foszforilációján keresztül az érett B sejtek túlélését eredményezi

A saját antigénekre specifikus B sejtek eliminálása nélkülözhetetlen a korai fejlődési lépések során az autoimmunitás megelőzése érdekében. A csontvelőben kialakuló éretlen vagy a lépben található korai 'tranzicionális' B sejt alakokban az antigénreceptoron érkező szignálok apoptózist indukálnak, míg az érett B sejtek számára a BCR aktiváció túlélő és proliferatív szignálokat biztosít. A BCR indukált jelpályák különbsége azonban az érett/éretlen B sejtek esetében szinte egyáltalán nem tisztázott.

Munkáink során a tranzicionális, illetve érett eger B sejtek aktivációt követő BCR jelátvitelét hasonlítottuk össze. Kimutattuk, hogy szemben az érett B sejtekkel az éretlen B sejtekben BCR stimulációt követően már alacsonyabb antigén dózissal történő aktiváció hatására is jelentős tirozin foszforiláció alakul ki. Ugyanakkor a Gab2 adapter fehérje intenzívebben foszforilálódott az érett B sejtekben. A Gab2-től downstream elhelyezkedő ERK1/2 transzkripciós faktorok aktivációja éretlen B sejtekben tranziensnek, míg érett B sejtekben hosszan fenntartott bizonyult. Az ERK1/2 foszforiláltságának csökkenése magyarázhatja az éretlen B sejtek esetében a proliferációs válasz hiányát. Egy további tanulmányunkban igazoltuk, hogy a Gab2 tirozin foszforilációjáért érett sejtekben a Lyn és Syk kinázok a felelősek a BCR aktivációt követően. A jelpálya folytatásaként a PI3K képes a Gab2-hez kapcsolódni és ezáltal a sejtmembrán közelébe lokalizálódik, ami az antiapoptotikus PI3K-AKT útvonal aktivációját idézi elő. Eredményeink szerint a Gab2 által közvetített túlélő szignál a B sejt autoimmunitás szabályozásának központi eleme lehet.

A TLR9 és BAFF indukált túlélő szignálok vizsgálata B sejtekben

A germinális centrumban zajló szelekció során a B sejtek Fas indukált apoptózissal elpusztulnak, amennyiben a sejteket érő túlélő szignálok nem kompenzálják a sejthalál stimulusokat. A legerősebb túlélő jelet a B sejtek számára a B sejt receptoron keresztül érkező aktivációs szignálok jelentik, biztosítva az antigénspecifikus, nagy affinitású B sejtek életben maradását. Munkáink során azt vizsgáltuk meg, hogy a nyirokcsomóban az immunválasz során megjelenő további szignálok, a B-cell activating factor (BAFF) illetve a TLR9 stimuláció, hogyan módosítják a Fas mediált apoptotikus és a BCR indukált túlélő jelek egyensúlyát.

A természetes immunrendszer sejtjei, illetve a folliculáris dendritikus sejtek által termelt BAFF az egyik legfontosabb citokin a B sejtekéréséhez. Ismert, hogy a B sejtek mintázat felismerő receptorokat is expresszálnak, amelyek a specifikus antigén receptorral szinergizálva képesek a B sejt aktivációt fokozni. A metilátlan CpG DNS szakaszokat felismerő TLR9-ről kimutattuk, hogy aktivációja gátolja a B sejtek Fas közvetített apoptózisát. A TLR9 indukált túlélő jelek mind a BCR, mind a BAFF általi túlélő jelekkel additívnak bizonyultak. Eredményeink szerint a TLR9 által generált túlélő jelek PKC, p38 és cABL kináz függőek, míg a BCR kiváltott túlélés PI3K és p38 aktiválódást igényelt. Kimutattuk, hogy a BCR által indukált PI3K és a TLR9 által kiváltott p38 aktiválódás egyaránt gátolta a Fas-mediált kaszpáz-8 aktivációt. Kimutattuk, hogy a Gab2 overexpressziója A20 B sejt vonalon megvédte a sejteket a Fas indukált apoptózissal szemben is és fokozta a BCR által közvetített túlélő jelek intenzitását.

Összességében elmondhatjuk, hogy a B sejtek nem antigénspecifikus receptorain keresztül érkező jelek, nemcsak a B sejtek proliferációját fokozzák, de a Fas indukált apoptózistól is megvédhetik a B sejteket. A BAFFR és TLR9 aktivációja így nem kizárólag a nagy affinitású B sejtek túlélését biztosítja, hanem a

természetes immunrendszer aktivációját követően növeli a szervezetben megmaradó B sejtek számát, ezáltal potenciálisan fokozza az immunválasz hatékonyságát, de egyúttal emeli az esetleges autoimmun reakciók kialakulásának valószínűségét is.

Az SHP1 foszfatáz szerepe a Fas mediált jelátvitel szabályozásában

A Fas indukált sejthalál folyamatok kezdeti lépéseiben a Fas receptor membrán raft lokalizációját, majd ezt követően a receptor internalizációját írták le. Ismert, hogy ezen lépések nélkülözhetetlenek az apototikus szignálok kialakulásához. A Fas-citoszkeleton kapcsolat pontos szabályozása, azonban még kevésbé ismert.

Munkánk során vizsgáltuk, hogy az SHP1 foszfatáz hogyan szabályozza a Fas szignalizációt. A20 B sejtvonalon csendesítettük az SHP1 mennyiségét és kimutattuk, hogy SHP1 hiányában jelentősen fokozódott a Fas függő sejthalál intenzitása. Eredményeink szerint az SHP1 konstitutívan asszociálódik a Fas receptorhoz és megakadályozza a sejthalál indukáló komplex kialakulását, majd az ezt követő kaszpáz-8, illetve kaszpáz-3 aktiválódást. FasL stimulációt követően az SHP1 disszociálódik a receptorról, ami lehetővé teszi a Fas indukált jelpályák aktiválódását. Az SHP1 szubsztrátját keresve bizonyítottuk, hogy a Vav (Rho/Rac guanin nucleotide csere faktor) defoszforilálódik Fas aktivációt követően, azonban az SHP1 csendesített sejtekben a Vav foszforilációja nem csökkent. A Vav mennyiségének csökkentése A20 B sejt vonalon fokozta a Fas közvetített sejthalált, illetve Vav KO egerekből származó B sejteken is intenzívebb sejthalál volt megfigyelhető, így kijelenthetjük, hogy a Vav az SHP1-hez hasonlóan a Fas indukált sejthalál negatív regulátora. A Vav protein hiánya nem fokozta az SHP1 hiányában már megemelkedett Fas indukált sejthalál intenzitást, mutatva, hogy a SHP1 és Vav azonos jelpályán keresztül regulálja a Fas jelátvitelét. Ennek megfelelően a Vav overexpressziója megvédte

a sejteket az SHP1 csendesítés által fokozott sejthaláltól. Az ezrin fehérjéről kimutatták, hogy a Fas-aktin kapcsolat kialakulásáért felelős, ezáltal segítve a Fas internalizációját, majd az ezt követő apoptotikus folyamatok elindulását. A Vav, illetve ezrin fehérjék overexpressziójával bizonyítottuk, hogy az SHP1 által defoszforilált Vav kompetitíven gátolja a Fas/ezrin és a Fas/aktin kapcsolatokat. A Fas receptor a defoszforilált Vav jelenlétében ezáltal nem képes a citoskeletonhoz kapcsolódni, ami megakadályozza a receptor endocitózisát és a sejthalál szignálok kialakulását.

Eredményeink újdonságot jelentettek a Fas receptor jelátvitelében, bizonyítva, hogy az SHP1 és Vav fehérjék a Fas-citoskeleton kapcsolat szabályozásán keresztül gátolják az apoptotikus szignálok kialakulását.

Az immunválaszban zajló citotoxikus mechanizmusok vizsgálata

Perifériás vér mononukleáris sejteiből izolált, majd *ex vivo* aktivált T sejtek, valamint phytohaemagglutinin-nal stimulált Jurkat T sejt vonal felülűszójának vizsgálatával kimutattuk, hogy az aktivált T sejtek szenzitívnek bizonyultak a felülűszó által indukált sejthalállal szemben, a vérből izolált nyugvó T sejtek azonban rezisztensek voltak. Az aktivált T sejtek felülűszójának citotoxikus hatásában kulcsfontosságúnak bizonyultak az ultracentrifugálással nyert szekretált vezikulumok. Mivel a T sejt felülűszó indukált sejthalál intenzitása alapvetően változatlan volt vad típusú illetve Fas receptort nem expresszáló célsejteket összehasonlítva, megállapíthattuk, hogy a citotoxikus T sejtek által termelt vezikulumok Fas független sejthalál folyamatokat is aktiváltak a target sejtekben. Az irodalmi adatoknak megfelelően Fas receptor jelenlétében főként apoptotikus sejthalál indukálódott, Fas hiányában azonban sem DNS fragmentáció sem kaspáz-3 aktivitás nem volt kimutatható. A szekretált vezikulumok használatakor z-vad pán kaspáz gátló jelenlétében is kialakult

sejthalál. Eredményeink szerint a szekretált vezikulumok által stimulált Fas független folyamatok következtében nem-apoptotikus sejthalál útvonalak aktiválódtak.

Ezt követően munkánk során összehasonlítottuk a szekretált vezikulumok által kiváltott Fas függő apoptotikus folyamatokat a rekombináns FasL, az anti-Fas ellenanyag, illetve a FasL-ot overexpresszáló sejtek jelenlétében indukálódott sejthalállal. Kimutattuk, hogy a szekretált vezikulumok által okozott, Fas-mediált sejthalál eltérő jelpályákat aktivált, mint a Fas receptor közvetlen stimulálásával kiváltott folyamatok. Kísérleteinkben FADD, kaspáz-8, kaspáz-9, illetve RIPK1 hiányos Jurkat sejtvonalak sejthalál érzékenységét hasonlítottuk össze vad típusú Jurkat sejtekével. Eredményeink szerint a szekretált vezikulum indukált apoptózis FADD hiányában is lezajlott, de feltétlen szükség volt RIP1 kináz jelenlétére. A rekombináns FasL stimuláció ezzel szemben FADD függő módon okozott apoptózist, RIPK1 hiányában is. A szekretált vezikulumok általi aktiváció a klasszikus Fas-FADD-kaspáz-8 jelpálya helyett, így Fas-RIPK1-kaspáz-8 útvonalon keresztül okozott apoptózist.

Feltételezésünk szerint a vezikulumokban található egyéb komponensek jelentősen befolyásolják a vezikulumok felszínén található FasL által indukált sejthalál folyamatokat, ami lehetővé teszi, hogy egyidejűleg többféle sejthalál folyamat aktiválódjon a célsejtekben. Ezek az újonnan feltárt sejthalál mechanizmusok segíthetnek az apoptózis rezisztens tumorok elpusztítását célzó terápiák kialakításában.

Az éretlen aktivált dendritikus sejtek felülűszója RIPK1-függő sejthalált indukál

A dendritikus sejtekről ismert, hogy képesek a fertőzött, vagy tumorsejtekből származó antigén fragmenseket keresztprezentációval MHC I-en keresztül bemutatni, ezáltal lehetővé válik a naiv CD8⁺ T sejtek aktiválása. Az intracelluláris antigének szinte kizárólag a sejtek pusztulását követően kerülhetnek át a DC-kbe. A folyamat során a sejthalál modalitása is meghatározó, nem minden sejthalál útvonal eredményez hatékony fagocitózist, DC aktivációt és migrációt, vagy keresztprezentációt.

Eredményeink szerint az éretlen, szövetekben lokalizált DC-k felülűszója PRR aktivációt követően képes sejthalált indukálni. Ez a folyamat nagyban segítheti az antigén átkerülését az elhaló sejteket fagocitáló DC-kbe, hozzáférhetővé téve az intracelluláris komponenseket is a DC számára. Kimutattuk, hogy a DC indukált sejthalál RIPK1-függő. Többféle immunogén sejthalál forma ismert, köztük elsőként azonosították a RIPK1-mediált folyamatokat. Ezek alapján valószínűsíthetjük, hogy a DC-k citotoxikus reakciói felgyorsítják a naiv T sejt aktivációt. Ez a megfigyelésünk egyben egy érdekes aspektusa PRR-DR együttműködésnek is, hiszen a PRR aktivált DC-k a sejthalál receptorok aktivációjával váltanak ki RIPK1 függő apoptózist a target sejtekben.

A mintázatfelismerő receptorok hatása a sejthalál és túlélő szignálokra, a flagellin fokozza a Fas indukált sejthalált

A sejthalál receptorok mellett több mintázatfelismerő receptorról is ismert, hogy sejthalált is okozhatnak. Megvizsgáltuk, hogy a mintázatfelismerő receptorok aktiválása módosítja-e a sejthalál receptorok szignalizációját. Kimutattuk, hogy a rekombináns flagellin, bár önmagában nem okozott sejthalált, de fokozta a FasL indukált apoptózist Jurkat sejteken. A flagellin azokban az esetekben is

fokozta az apoptózist, ha a FasL helyett TNF, illetve TRAIL receptorok stimulálásával, vagy a citotoxikus T sejtek felülűszójával indukáltunk sejthalált. Eredményeinket megerősítettük vad típusú, illetve flagellin hiányos *Salmonella enteritidis* baktériumok felülűszóját használva is. A vad típusú baktériumok felülűszója a rekombináns flagellinhez hasonlóan fokozta a sejthalál receptorok által indukált apoptózist, azonban a flagellin deficiens felülűszó hatástalannak bizonyult. Ez a hatás TLR5 antagonistá ellenanyag használatával gátolható volt, így ez a receptor tehető felelőssé flagellin jelenlétében kialakuló intenzívebb sejtpusztulás kialakulásáért. Flagellin hatására a sejthalál receptorok RIPK1-függő apoptotikus jelpályákat is aktiválnak, mivel a flagellin sejthalált fokozó hatása csak RIPK1-et expresszáló Jurkat sejteken volt megfigyelhető, RIPK1 deficiens sejteken azonban a sejtpusztulás mértéke nem változott. Eredményeink alapján, a mintázat felismerő receptorok (TLR5) egyidejű aktivációja a sejthalál receptorokkal, a kialakuló sejthalál folyamatok immunogenitását fokozza, ezáltal serkentve a T sejt válasz beindulását.

A kaszpáz-9 szabályozza a nekroptotikus sejthalált

A különböző sejthalál folyamatok átkapcsolását szabályozó molekuláris programok nem minden esetben, illetve nem pontosan ismertek. A kaszpáz-9-et, mint a mitokondriális apoptotikus útvonal iniciátor kaszpázát írták le, azonban szerepe a nekroptózisban egyáltalán nem volt ismert. *In vitro* kísérleteinkben kimutattuk, hogy sejthalál és mintázatfelismerő receptorok stimulálása nekroptózist indukál vad típusú Jurkat és MEF sejtvonalakban, azonban kaszpáz-9 hiányos megfelelőikben nem. *In vitro* eredményeinket a kaszpáz-9 nekroptózisban játszott szerepéről egy *in vivo* pankreatitisz modellben is megerősítettük, amelyben a kaszpáz-9 acinus sejt specifikus hiánya gátolta a RIPK1 és RIPK3 foszforilációját és a pankreatitisz kialakulását cerulein indukciót követően.

Irodalmi adatok szerint nekroptotikus stimulus hiányában az Aurora kináz konstitutívan RIPK1-hez és RIPK3-hoz kapcsolódik és így gátolja a spontán nekroptózis kialakulását. Saját eredményeink szerint a kaspáz-9 hiányos Jurkat sejteken is a vad típusú sejtekkel azonos intenzitású nekroptózis indukálható az Aurora kináz gátló szuboptimális (önmagában nem toxikus) koncentrációban történő használata mellett. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a kaspáz-9 nem feltétlen szükséges a nekroptózishoz, szentitizált sejteken annak hiányában is végbe mehet a folyamat. Hasonló eredményeket kaptunk RIPK1 vagy RIPK3 overexpressziót követően is, mivel mindkét overexpresszált sejtben kaspáz-9 hiányában is kialakult nekroptózis.

Feltételezzük, hogy a kaspáz-9, amely a mitokondriális apoptózis kulcsmolekulája, szerepet játszik a nekroptózisban is, így részt vehet az apoptózis nekroptózis átmenet szabályozásában. Ésszerű feltételezni, hogy az egyes jelpályák közös molekulái szabályozhatják az átmenetet az egyik sejthalál útról a másikra, ezért a kaspáz-9 ezáltal vonzó célpontot lehet a farmakológiai beavatkozásokhoz a sejthalál diszregulációja esetén.

Az antiinflammatorikus és a proinflammatorikus makrofágok makrofágok sejthalál érzékenysége eltérő

Az immunrendszer egyes sejtjei, azok altípusai eltérő érzékenységgel a különböző sejthalál szignálokra. A sejtípusok eltérő fogékonysága a sejthalál stimulusokra terápiás lehetőséget nyújthat a sejt arányok módosításán keresztül. Kimutattuk, hogy az proinflammatorikus M1 és az antiinflammatorikus M2 makrofágok a legtöbb vizsgált apoptotikus és nekroptotikus szignálra egyformán érzékenyek, azonban a TAK1 inhibitor jelenlétében indukált nekroptózis az M2, valamint a tumor asszociált makrofágokban szignifikánsan erősebb sejthalált indukált, mint M1 sejtekben. Eredményeink szerint az Aurora kináz gátlásával

az M1 makrofágok is érzékennyé válnak a TAK1 inhibitor indukált nekroptózisra, így feltételezzük, hogy az M1 sejtekben egy Aurora kináz-mediált túlélő jel is működik, szemben az M2 altípussal.

A kemoterápiás szerek hatása a tumor sejtek sejthalálára intenzíven vizsgált, azonban keveset tudunk, hogy hogyan módosítják a tumor környezetben található plasztikus sejtek arányát, működését. Kimutattuk, hogy az M1 makrofágok érzékenyebbek a doxorubicin indukált sejthalálra, mint az M2 altípus. Összességében megállapíthatjuk, hogy az M1-M2 polarizált makrofág populációk összetétele befolyásolható eltérő sejthalál érzékenységükön keresztül, ami új terápiás megközelítéseket tesz lehetővé.

Legfontosabb új eredmények:

(1) A limfociták fejlődésekor az elsődleges immunszervekben lezajló negatív és pozitív szelekciós lépések során az önveszélyes és működésképtelen klónok eliminálódnak. Vizsgáltuk a BCR-mediált jelátviteli különbségeket a negatív szelekcióban érintett éretlen és a perifériás immunválaszban résztvevő érett B sejtek közt. Kimutattuk, hogy

- az éretlen B-sejtekben az anti-IgM stimulus intenzívebb tirozinszofoszforylációt eredményez, mint az érett populációban.
- érett B sejtekben a BCR aktivációt követően a Gab2 adapter fehérje tirozinon foszforilációja intenzívebb, mint éretlen B sejtekben.
- a Gab2 adapter proetin foszforilálódása az anti-apoptotikus PI3K-AKT útvonal aktivációját idézi elő
- az érett B sejtekben BCR aktiváció hatására jelentős mennyiségű ERK kötődött a Gab1/2 fehérjékhez, éretlen B sejtekben az ERK asszociációja nem indukálódott.
- érett sejtekben az ERK foszforilációja tartósan fennmaradt, szemben az éretlen B sejtekben megfigyeltekkel, és az Elk-1 és a CREB aktiváció is átmeneti volt éretlen B sejtekben, követve az ERK foszforiláció kinetikáját.

(2) A germinális centrum reakciók során a FasL stimulus a B sejtek apoptózisát indukálja, azonban az antigén felismerése túlélő jeleket közvetíthet. Kimutattuk, hogy

- a Fas-indukált apoptózissal szemben a BCR túlélő jeleket indukál, amely hatását a BAFFR és a TLR9 stimuláció is fokozta egér B sejteken.
- a TLR9 által generált túlélő jelek PKC, p38 és cABL kináz függőek, míg a BCR kiváltott túlélés PI3K és p38 aktiválódást igényelt.

(3) Magvas sejteink szinte mindegyikén expresszálódik FAS receptor, ami lehetővé teszi az immunrendszer számára a sejtek eliminációját. Vizsgáltuk,

hogy a Fas-mediált jelátvitelt milyen reverzibilis mechanizmusok szabályozzák. Kimutattuk, hogy

- B-sejtekben az SHP1 tirozin foszfatáz konstitutívan kapcsolódik a Fas receptorhoz és megakadályozza a sejthalál indukáló komplex kialakulását, majd az ezt követő apoptotikus kaszkád aktiválódást.
- a Vav Rho/Rac guanin nukleotid csere faktor, SHP1 függő módon defoszforilálódik Fas aktivációt követően.
- a Vav fehérje mennyiségének csökkentése A20 B sejt vonalon fokozta a Fas- közvetített sejthalál intenzitását, míg a Vav overexpressziója megvédte a sejteket az SHP1 csendesítés által fokozott sejthaláltól
- az SHP1 foszfatáz által defoszforilált Vav kompetitíven gátolja a Fas/ezrin és a Fas/aktin kapcsolatokat, ami megakadályozza a Fas receptor endocitózisát és a sejthalál szignálok kialakulását.

(4) A sejthalál receptorok és a mintázatfelismerő receptorok interakciója kevésbé vizsgált terület. Kimutattuk, hogy

- a rekombináns flagellin, bár önmagában nem okozott sejthalált, de fokozta a sejthalál receptorok stimulálásával kiváltott apoptózist Jurkat sejteken
- a vad típusú *Salmonella enteritidis* baktériumok felülűszója a rekombináns flagellinhez hasonlóan fokozta a sejthalál receptorok által indukált apoptózist, azonban a flagellin hiányos felülűszó hatástalannak bizonyult.
- a flagellin jelenlétében kialakuló intenzívebb sejtpusztulás kialakulásáért a TLR5 a receptor tehető felelőssé.
- flagellin hatására a sejthalál receptorok RIPK1-függő apoptotikus jelpályákat is aktiválnak.

(5) Az immunválasz citotoxikus mechanizmusai szabályozzák a sejthalál immunológiai kimenetelét is. Kimutattuk, hogy

- RIPK1-dependens sejthalál utak aktiválódnak a T sejtek és a dendritikus sejtek által közvetített citotoxikus reakciókban.

- a citotoxikus T sejtek által termelt vezikulumok Fas függő és Fas független sejthalál folyamatokat egyaránt aktiváltak a target sejtekben.
- a citotoxikus T sejtek élő funkcióinak hatására Fas receptor jelenlétében főként apoptotikus sejthalál indukálódott, Fas hiányában azonban sem DNS fragmentáció sem kaspáz-3 aktivitás nem volt kimutatható
- a szekretált vezikulumok általi aktiváció a klasszikus Fas-FADD-kaspáz-8 jelátviteli helyett, a Fas-függő RIPK1-kaspáz-8 útvonalon keresztül okozott apoptózist.
- LPS vagy CL075 aktivációt követően a humán éretlen monocita eredetű dendritikus sejtek felülűszója TNF-függő apoptózist indukál.
- a dendritikus sejtek felülűszója RIPK1-függő és -független apoptózist indukál
- a dexametazon által kiváltott tolerogén stimulus csökkenti az éretlen dendritikus sejtek citotoxikus kapacitását.

(6) A különböző immunológiai kimenetű sejthalál folyamatok átmenetének szabályozása kulcsfontosságú lehet a steril gyulladással járó kórképek terápiájában. Kimutattuk, hogy

- A sejthalál és mintázatfelismerő receptorok stimulálása nekroptózist indukál vad típusú Jurkat és MEF sejtvonalakban, azonban kaspáz-9 hiányos megfelelőikben nem.
- A kaspáz-9 *in vivo* hozzájárul a cerulein által kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához.
- A kaspáz-9 szabályozza a nekroszóma kialakulását.
- Az AURKA vagy szubsztrátja, a GSK3 β gátlása helyreállította a kaspáz-9 hiányos sejtek nekroptózis érzékenységét

(7) Az M1 proinflammatorikus és az M2 antiinflammatorikus sejtek egyensúlya meghatározó az immunválasz polarizálásában. Olyan sejthalál stimulusokat kerestünk, amelyekkel a két sejttípus aránya szabályozható. Kimutattuk, hogy

- az M2 és a tumor asszociált makrofágok érzékenyek voltak a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózisra, szemben az M1 makrofágokkal.
- az AURKA vagy a GSK3 β inhibitorok jelenlétében az M1 makrofágok is érzékenyvé váltak a TAK1 inhibitor által kiváltott sejthalálra
- a makrofágokban legalább két különböző nekroptotikus útvonal működik.
- Az M1 makrofágok érzékenyebbek a doxorubicin által kiváltott sejthalálra, mint M2 társaik.

(8) A kemoterápiás szerek hatása a természetes immunrendszer tumorkörnyezetben elhelyezkedő plasztikus sejtpopulációira kevésbé tanulmányozott. Kimutattuk hogy

- Az antraciklinek jelenlétében történő differenciálódás dóziszfüggően növeli a CTLA-4 expresszióját dendritikus sejtekben.
- A hasonló alapon működő kemoterápiás szerek (egyres platina alapú, illetve antraciklin szerek) eltérő hatással lehetnek a makrofágok és DC-k kemotaktikus potenciáljára, citokintermelésre és T-sejt polarizációs képességére.

A tézisek a következő saját közleményeken alapulnak

Koncz G, Bodor Cs, Kövesdi D, Gáti R, Sármay G. BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells *Immunol. Letters* 2002, 00: 1-9

Koncz G, Kerekes K, Chakrabandhu K, Hueber AO. Regulating Vav1 phosphorylation by the SHP-1 tyrosine phosphatase is a fine-tuning mechanism for the negative regulation of DISC formation and Fas-mediated cell death signaling. *Cell Death Differ.* 2008, 3:494-503.

Hancz A, Hérincs Z, Neer Z, Sármay G, **Koncz G**. Integration signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) and Fas (CD95). *Immunol Lett.* 2008, 116: 211-217.

Maus M, Medgyesi D, Kövesdi D, Csuka D, **Koncz G**., Sármay G. GRB2 associated binder 2 (GAB2) adaptor couples B-cell receptor to cell survival *Cell Signal.* 2009. 2:220-7.

Koncz G, Anikó Hancz, Chakrabandhu K, Gogolák P, Kerekes K, Rajnavölgyi É, Hueber AO, Vesicles released by activated T cells induce Fas-mediated RIP-dependent apoptosis simultaneously with Fas-independent non-apoptotic cell death *J Immunol.* 2012, 189:2815-23

Hancz A, **Koncz G**, Szili D, Sarmay G, TLR9 mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis by p38 MAPK dependent inactivation of caspase 8 *Immunol Lett.* 2012. 143:77-84.

Hancz D, Szabo A, Molnar T, Varga Z, Hancz A, Gregus A, Hueber AO, Rajnavolgyi E, **Koncz G**: Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner *Immunol Lett.* 2018,193:42-50.

Varga Z, Molnár T, Mázló A, Kovács R, Jenei V, Kerekes K, Bácsi A, **Koncz G**. Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 2020 May 29.

Varga Z, Rác E, Mázló A, Korodi M, Szabó A, Molnár T, Szöör Á, Veréb Z, Bácsi A, **Koncz G**. Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death. *Immunobiology.* 2021 Jan;226(1):152032.

Molnár T, Pallagi P, Tél B, Király R, Csoma E, Jenei V, Varga Z, Gogolák P, Odile Hueber A, Máté Z, Erdélyi F, Szabó G, Pettkó-Szandtner A, Bácsi A, Virág L, Maléth J, **Koncz G**. Caspase-9 acts as a regulator of necroptotic cell death. FEBS J. 2021 Apr 25.

Burai S, Kovács R, Molnár T, Tóth M, Szendi-Szatmári T, Jenei V, Bíró-Debreceni Z, Brisco S, Balázs M, Bácsi A, **Koncz G**,* Mázló A.* Comprehensive analysis of different tumor cell-line produced soluble mediators on the differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. PLOS ONE **corresponding author*

Jenei V, Burai S, Molnár T, Kardos B, Mácsik R, Tóth M, Debreceni Z, Bácsi A, Mázló A, **Koncz G**. Comparison of the immunomodulatory potential of platinum-based anti-cancer drugs and anthracyclins on human monocyte-derived cells. Cancer Chemother Pharmacol. 2023 Jan;91(1):53-66. doi: 10.1007/s00280-022-04497-1. Epub 2022 Nov 30

Egyéb közlemények a doktori disszertáció óta:

Muzsai S, Maryanovsky OM, Ander R, **Koncz G**, Mázló A, Bácsi A, Tóth M. Cell-Free Supernatant Derived from a Lactobacillus casei BL23 Culture Modifies the Antiviral and Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stromal Cells. Biomedicines. 2023 May 24;11(6):1521.

Emri G, Paragh G, Tósaki Á, Janka E, Kollár S, Hegedűs C, Gellén E, Horkay I, **Koncz G**, Remenyik É. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update. J Photochem Photobiol B. 2018, 185:169-175.

Hornay L, Dobos N, **Koncz G**, Karányi Z, Páll D, Szabó Z, Halmos G, Székvölgyi L. The Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Cancer Development, Diagnostics, and Therapy, Front Immunol. 2018, 9:151.

Szabo A, Gogolák P, **Koncz G**, Foldvari Z, Pazmandi K, Miltner N, Poliska S, Bácsi A, Djurovic S, Rajnavolgyi E. Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT2B in a subset of human dendritic cells. Sci Rep. 2018, 1:1765.

Szabo A, Fekete T, **Koncz G**, Kumar BV, Pazmandi K, Foldvari Z, Hegedus B, Garay T, Bacsi A, Rajnavolgyi E, Lanyi A. RIG-I inhibits the MAPK-dependent proliferation of BRAF mutant melanoma cells via MKP-1 Cell Signal. 2016, 5:335-47

Fekete T, Pazmandi K, Szabo A, Bacsi A, **Koncz G**, Rajnavölgyi E The antiviral immune response in human conventional dendritic cells is controlled by the mammalian target of rapamycin J Leukoc Biol. 2014, 4:579-89

Kovács E, Szilágyi L, **Koncz G**, Lányi Sz, Ábrahám B Enhanced in vitro refolding of soluble human Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Related Ligand, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013,170 819-30

Koncz G and Hueber AO: The Fas/CD95 receptor regulates the death of autoreactive B cells and the selection of antigen-specific B cells. Front Immunol. 2012;3:207

Medgyesi D, Sarkozi R, **Koncz G**, Arato K, Varadi G, Toth GK, Sarmay G. Functional consequences of a MAPK docking site on human FcgammaRIIb. Immunol Lett. 2004. 92:83-90

Medgyesi D, Uray K, Sallai K, Hudecz F, **Koncz G**, Abramson J, Pecht I, Sarmay G, Gergely J. Functional mapping of the Fc gamma RII binding site on human IgG1 by synthetic peptides. Eur J Immunol. 2004, 34:1127-35.

Sármay G, **Koncz G**, Bodor Cs, Kövesdi D, Gáti R, Gergely J. Signaling pathways leading to apoptosis or survival in immature and mature B cells Ann.N.Y.Acad.Sci. 2002, 973:1-5

Kövesdi D, **Koncz G**, Iványi N.R, Ishiai M, Kurosaki T, Gergely J, Haimovich J., Sármay G. Developmental differences in B cell receptor induced signal transduction Cellular Signalling 2002 6:563-72.

Tudományometriai adatok:

In extenso közlemények száma 43

angol nyelven: 42

magyar nyelven: 1

In extenso közlemények száma a PhD előtt: 11

In extenso közlemények száma a PhD után: 32

In extenso első szerzős közlemények száma: 8

In extenso utolsó szerzős közlemények száma: 11

Összesített impakt faktor: 171,47

Független hivatkozások száma: 802

Hirsch-index: 17