

koncz.gabor\_172\_24

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Apoptotikus és nem apoptotikus sejthalál folyamatok szerepe az immunválasz  
szabályozásában

Dr. Koncz Gábor



DEBRECENI EGYETEM  
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR  
IMMUNOLÓGIAI INTÉZET  
Debrecen, 2024

## TARTALOMJEGYZÉK

### Tartalom

1	BEVEZETÉS: .....	6
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
2.1	Intrinszik, mitokondriális apoptózis .....	7
2.2	A BCL-2 fehérjecsald szerepe az apoptózisban .....	7
2.3	Az apoptózis inhibitor proteinek és a SMAC.....	10
2.4	A kaspáz-9 .....	11
2.5	Extrinszik, sejthalál receptor-mediált apoptózis:.....	12
2.6	Nekroptózis .....	15
2.6.1	A sejthalál receptor indukált nekroptózis jelátvitelének vázlatos összefoglalása.....	15
2.6.2	Mintázatfelismerő receptorok által indukált nekroptózis .....	16
2.6.3	A nekroptózis szabályozása.....	17
2.7	A FAS-indukált sejthalál szerepe B sejteken .....	18
2.7.1	Túlélő szignálok és a Fas-indukált sejthalál együttműködése az antigén specifikus B sejtek szelekciónjában .....	19
2.7.2	A BAFF szerepe a B sejtek életképességének szabályozásában .....	21
2.7.3	A TLR9 szerepe a B sejtek életképességének szabályozásában.....	22
2.8	A sejthalál receptorok szerepe az immunrendszer citotoxikus funkcióiban.....	23
2.9	Makrofág alpopulációk immunológiai szerepe .....	25
2.10	A dendritikus sejtek szerepe az immunválasz citotoxikus funkcióinak szabályozásában.....	27
2.10.1	A dendritikus sejtek szerepe a tumor regulált immunreakciókban.....	27
2.10.2	A dendritikus sejtek citotoxikus funkciói.....	28
2.11	Az immunogén sejthalál .....	28
3	CÉLKITŰZÉSEK .....	30
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	31
4.1	Felhasznált sejtípusok .....	31
4.2	Sejthalál mérése.....	33
4.3	B sejt aktiváció mérése.....	34
4.4	Makrofág és dendritikus sejt funkciók vizsgálata .....	36
4.5	In vitro sejt módosítások .....	37
4.6	In vivo vizsgálatok .....	38
4.7	Statisztikai analízis .....	40
5	EREDMÉNYEK .....	41

# koncz.gabor\_172\_24

5.1	Az SHP-1 a Fas-citoszkeleton kapcsolat szabályozásán keresztül befolyásolja az apoptózist .....	41
5.2	A TLR-9 és a BAFF túlélő jelet közvetít a B sejtek számára a Fas-indukált apoptózissal szemben .....	46
5.3	A BCR-mediált szignálok eltérései érett és értelen B sejteken .....	49
5.4	A flagellin fokozza a Fas-indukált sejthalált .....	51
5.5	A citotoxikus T sejtek Fas-függő apoptotikus és nem-apoptotikus sejthalált is indukálnak	54
5.6	Aktivációt követően az éretlen dendritikus sejtek felülűszója RIPK1-függő sejthalált indukál .....	60
5.7	A kaszpáz-9 szabályozza a nekroptózis kialakulását .....	64
5.8	Az anti-inflammatórikus makrofágok érzékenyebbek a TAK1 inhibitor indukált nekroptózisra, mint a proinflammatórikus makrofágok .....	71
5.9	A platina alapú rákellenes gyógyszerek és antraciklinek immunmoduláló potenciáljának összehasonlítása humán monocita eredetű sejteken .....	77
6	DISZKUSSZIÓ .....	84
7	LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK: .....	94
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	97
9	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK, TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK .....	98
9.1	Tudománymetriai adatok.....	98
9.2	Az értekezést megalapozó közlemények .....	99
9.3	Saját közlemények.....	101
10	IRODALOMJEGYZÉK.....	106

## FONTOSABB RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

APAF-1:	Apoptotic protease activating factor 1
AURKA:	Aurora kinase A
BAD:	Bcl-2-associated death promoter
BAK:	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX:	Bcl-2-associated X protein
BCL-2:	B-cell lymphoma 2
BCL-XL:	B-cell lymphoma-extra large
BH:	Bcl-2 homology domain
BID:	BH3 interacting-domain death agonist
BIM:	Bcl-2-like protein 11
BIK:	Bcl-2-interacting killer
BIR3:	Baculovirus inhibitory repeat domain 3
BLK:	B Lymphoid Tyrosine Kinase
BMF:	Bcl-2-modifying factor
BOK:	Bcl-2 related ovarian killer
CARD:	Caspase recruitment domain
CCL-	Chemokine (C-C motif) ligand
cIAP1:	Cellular inhibitor of apoptosis protein-1
CK2:	Casein kinase 2
CHX:	Cycloheximide
CYLD:	Cylindromatosis
DAMP:	Damage-associated molecular pattern
DD:	Death domain
DISC:	Death-inducing signaling complex
ERK1:	Extracellular signal-regulated kinase 1
FADD:	Fas-associated death domain protein
FasL:	Fas ligand
FLIP <sub>L</sub> :	FLICE-like inhibitory protein, long isoform
Gab1/2 :	Grb2 associated binder proteins
GSK3 $\beta$ :	Glycogen synthase kinase 3 beta
HMGB1:	High-mobility group protein 1
Hrk:	Harakiri
HSP:	Heat shock protein
HSV-1:	Herpes simplex virus 1
HtrA2:	High temperature requirement protein A2
ICD:	Immunogenic cell death
IFN $\gamma$ :	Interferon gamma

## koncz.gabor\_172\_24

JNK:	c-Jun N-terminal kinase
IKK:	I $\kappa$ B kinase
LPS:	Lipopolysaccharide
MAPK:	Mitogen-activated protein kinase
MCL1:	Bcl-2-like protein 3
MLKL:	Mixed lineage kinase domain-like protein
MK2:	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase 2
MYD88:	Myeloid differentiation primary response 88
Nec1:	Necrostatin-1
NEMO:	NF- $\kappa$ B essential modulator
NF- $\kappa$ B:	Nuclear factor- $\kappa$ b
NSA:	Necrosulfonamide
PAMP:	Pathogen associated molecular pattern
PKA:	Protein kinase A
PKC $\zeta$ :	Protein kinase C zeta
PPM1b:	Protein phosphatase 1 b
PUMA:	p53 upregulated modulator of apoptosis
RHIM:	RIP homotypic interaction motif
RIPK1:	Receptor-interacting protein kinase 1
SMAC:	Second mitochondria derived activator of caspase
STAT1:	Signal transducer and activator of transcription 1
TAB:	TAK1-binding protein
TAK1:	Transforming growth factor beta activated kinase-1
TAM-	Tumor-associated macrophage
TNF:	Tumor necrosis factor
TLR:	Toll-like receptor
TRADD:	TNF receptor associated death domain
TRAF2:	TNF receptor associated factor 2
TRAIL:	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRIF:	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
XIAP:	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZBP1:	Z-DNA-binding protein 1

## 1 BEVEZETÉS:

A többsejtű élőlények bármely sejtje elpusztulhat a szervezet homeosztázisának fenntartása érdekében. Az egyes sejtek funkcionalitását, épségét a sejtek belső önellenőrző programjai kontrollálják, valamint az immunrendszer is felügyeli sejtjeinket. A kórokozók elpusztítása mellett az immunválasz mechanizmusai a szervezet szinte bármely saját sejtjét is képesek eliminálni. Az immunválasz során az intracelluláris patogének mellett a tumorok kialakulása is aktiválhatja ezeket az ölő mechanizmusokat. Továbbá a sejthalál folyamatok nélkülözhetetlenek az autoimmunitás kialakulásának megakadályozásában is. Ennek megfelelően az immunrendszer sejthalál indukáló képességének csökkenése, *autoimmunbetegségek*, *tumorok*, *fertőzések* kialakulásához vezethet, míg túlzott reakciói különböző degeneratív betegségek megjelenéséhez.

Az egyes sejthalál formák direkt hatásuk mellett, eltérő immunológiai kimenetükön keresztül is befolyásolják az immunválasz lefolyását. A sejthalál folyamatok immunológiai kimenetének diszregulációja *gyulladásos kórképekhez* és a szövet regeneráció hibáihoz vezethet.

Az *autoimmunitás* szabályozásában az elsődleges immunszervekben zajló, rendkívül intenzív sejtpusztulással járó pozitív és negatív szelekciós lépések mellett a perifériás tolerancia kialakulásához is szükséges a sejthalál folyamatok megfelelő működése. T sejtek esetében az aktiváció indukált sejthalál (AICD), míg a B sejteknél a germinális centrumokban zajló szelekciós lépések járulnak hozzá elsősorban az autoreaktív klónok számának csökkentéséhez. Ezen folyamatok szabályozását több közleményünkben is tanulmányoztuk. Mindkét folyamatban a Fas receptor által aktivált sejthalál folyamatok felelősek a felesleges limfociták eltávolításért, az immuntolerancia szabályozásáért. Dolgozatunk egyik fő témája a Fas-indukált jelátvitel tanulmányozása, az immunrendszerre gyakorolt hatásának vizsgálata.

A *tumorok* alapvető tulajdonságai közé tartozik a sejthalál gátlása és az immunválasz elkerülése is. A tumor mikrokozonyzatának összetétele, sejtjeinek polarizációja meghatározó a tumor túlélése és a metasztázisok kialakulása szempontjából is. Míg a sejthalál terápiás indukciója tumorsejtekben intenzíven vizsgált terület, a sejthalál hatása az immunsejtek összetételére a tumor mikrokozonyzatban alig tanulmányozott. Munkánk során vizsgáltuk különböző sejthalál szignálok hatását immunogén és tolerogén makrofág és dendritikus sejt alpopulációkra.

Az *intracelluláris fertőzések* elleni védekezés legfőbb mechanizmusa a fertőzött, saját sejtek eliminációja, a „patogén niche” csökkentése. Ennek megfelelően a sejthalál receptorok által indukált apoptózis mellett a kórokozókat érzékelő mintázatfelismerő receptorok is aktiválhatnak sejthalál folyamatokat. A két receptor típus együttműködéséről kevés adat áll rendelkezésünkre, ezért tanulmányoztuk a sejthalál és mintázat felismerő receptorok egyidejű aktivációjának hatását.

A *gyulladás* elkerülése miatt az elhaló sejtek érzékelése és eltávolítása is az immunrendszer feladatai közé tartozik. A sejthalál folyamatok lezajlásának mechanizmusa is befolyásolja az immunreakciókat.

A szervezett számára előnyös sejthalál immunológiai kimenete általában tolerogén válaszhoz vezet, azonban a veszély szignálokat generáló sejthalál folyamatok az immunrendszer aktivációját, gyulladást eredményezhetnek. A tolerogén és immunogén sejthalál folyamatok optimális egyensúlya nélkülözhetetlen az immunrendszer homeosztatikus működéséhez. A sejthalál formák immunológiai kimenetének alakítása, terápiás manipulálásának lehetőségei még nem ismertek. Kutatásainkban a leggyakoribb, tolerogén sejthalál folyamat a mitokondriális apoptózis és a gyulladás indukáló nekroptózis egymásra gyakorolt hatását vizsgáltuk.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Intrinszik, mitokondriális apoptózis

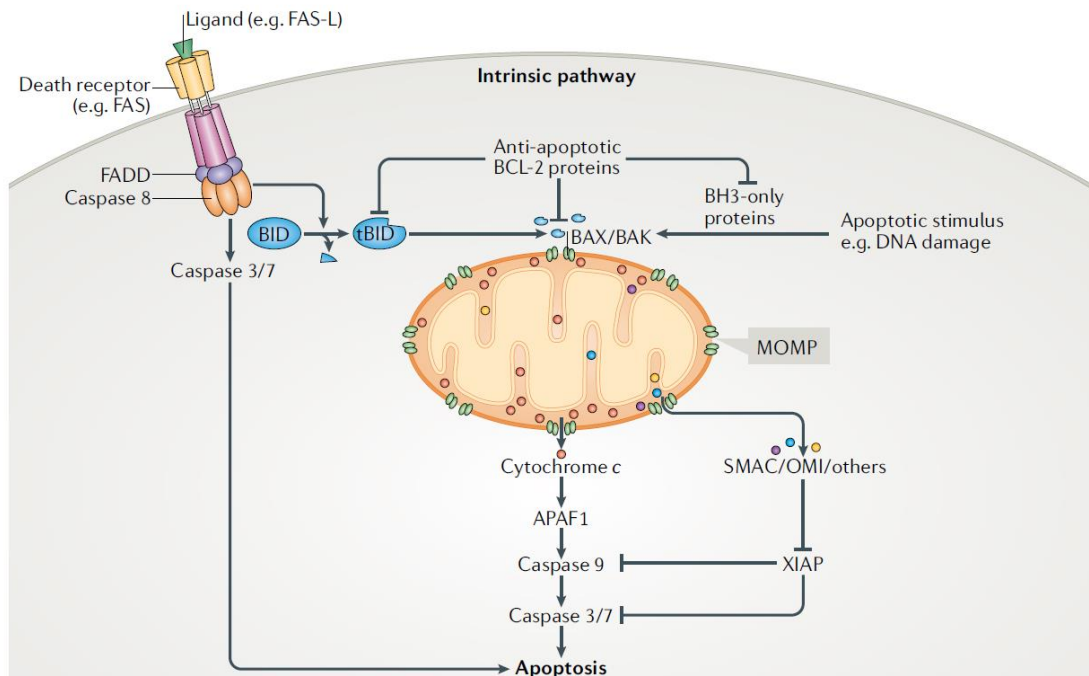
A mitokondriális apoptózis folyamatai felelősek a szervezetben zajló sejtelhalás döntő hányadáért. Ezen az útvonalon keresztül szabályozódik a sejtek programozott sejthalála, féléletidejének meghatározása. A programozott sejthalál mellett a sejteket ért különböző stressz szignálok, vagy a túlélő jelek hiánya is kiválthatja ezen az útvonalon keresztül a sejtek szabályozott pusztulását. Az intrinszik apoptózis kulcs lépése a mitokondrium membrán permeabilitásának megváltozása, aminek eredményeként a mitokondriális térből citokróm c és több, az apoptózis lefolyását szabályozó faktor kerül a citoplazmába. A citokróm c az Apoptotic protease activating factor 1-gyel (APAF-1) komplexet képezve annak konformáció változását idézi elő. A nyitott konformációba kerülő APAF-1 caspase activation and recruitment domains (CARD) doménje ezt követően kapcsolatot létesíthet a kaszpáz-9 (CARD) doménjével. A folyamat a citokróm c/APAF-1/kaspáz-9-ből összeálló apoptoszóma összeszerelődését eredményezi. A kaszpáz-9, mint a mitokondriális apoptózis iniciátor kaszpáza ismert. A kaszpáz-9 oligomerizációja, illetve konformáció változása lehetővé teszi a molekula transz-autoproteolízisét, ami a molekula aktivitásához vezet. Ezt követően akaspáz-9 beindítja a kaszpáz kaszkádot az effektor kaszpázok (3/7) inaktív proformáinak hasításán keresztül és így az apoptotikus sejthalált [1] (**1. ábra**).

### 2.2 A BCL-2 fehérjecsalád szerepe az apoptózisban

Az intrinszik apoptózis folyamata több lépcsőben szabályozott. A mitokondrium külső membránjának permeabilitását a BCL-2 fehérje család pro- és antiapoptotikus tagjainak mennyisége és aktivitása ellenőrzi. A BCL-2 Associated X-protein, a BCL-2 homologous antagonist/killer és a BCL-2 related ovarian killer (BAX, BAK és BOK) pórusképző fehérjék felelősek közvetlenül membrán átjárhatóság fokozódásáért, a citokróm c felszabadulásáért [2].

A BOK működése - a másik két pórusképző tagtól eltérően - független a BCL-2 család többi tagjától, az apoptózisban betöltött szerepe is vitatott [3]. (A BOK fehérje szerepet játszik az endoplazmatikus retikulum/mitokondrium kontaktzónáinak szabályozásában is [4].) Sejthalál indukáló szerepe elsősorban a proteaszóma rendszer hibáihoz kapcsolódik. A BOK konstitutívan ubiquitinálódik és az ER-függő proteaszóma rendszerben folyamatosan bomlik, így inaktívulódik. A proteaszóma rendszert

érintő hibák, vagy különböző ER stressz folyamatok a BOK félelet idejét növelik, így lehetővé válik mitokondriális membránba történő transzlokációja, aminek eredményeként a hibás sejt apoptózissal elpusztul [4].

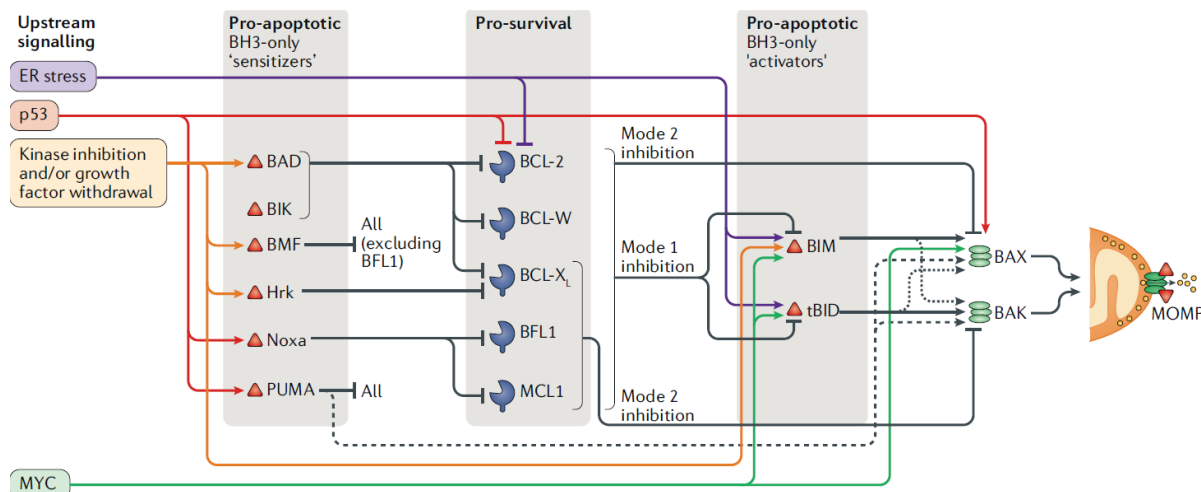


**1. ábra. Az apoptotikus jelpályák összefoglalása.** A sejtet ért pozitív és negatív hatások a BCL-2 fehérjecsalád pro és antiapoptikus tagjainak mennyiségén keresztül befolyásolják a sejt életképességét, amelyek a BAK és BAX proteinek legfőbb szabályozói. Az intrinszik vagy mitokondriális útvonal aktiválódását követően a BAX és BAK fehérjék a mitokondrium külső membránján pórusokat képeznek, ami lehetővé teszi a citokróm c és további apoptózist segítő fehérjék (SMAC, OMI) citoplazmába áramlását. A citokróm c felszabadulása és az apoptózis inhibitor proteinek (például XIAP) gátlása az apoptószóma (citokróm-c/APAF-1/kaspáz-9) komplex összeszerelését, ezen keresztül az effektor kaspázok (3/7) aktivációját és a sejt rendezett szétesését indukálják. Az extrinszik útvonalon a sejtfelszínen expresszálandó sejthalál receptorok specifikus ligandumokkal történő aktivációja, a receptorok oligomerizációját, a sejthalál indukáló komplex (receptor/FADD/kaspáz-8) összeállítását eredményezi. A kaspáz-8 direkt módon, illetve a Bid hasításán keresztül növelve a proapoptotikus fehérjék mennyiségét, az intrinszik útvonalon keresztül is aktiválhatja az effektor kaspázokat [2].

A konstitutívan inaktív formában a mitokondrium membránban lokalizált BAK és a citoplazmában található BAX szerepe az apoptózisban nagyrészt redundáns. Homo- vagy hetero-oligomerizációjuk nagyméretű, akár több száz molekulából álló komplexet, pórusokat hozhat létre a mitokondrium membránban, ami lehetővé teszi az intermembrán térből egyes molekulák citoplazmába áramlását [5]. A pórus mérete, kialakulásának kinetikája fontos szabályozó tényezők [6], de ennek részletei a dolgozat témáját nem érintik. A BAK és BAX alapvetően inaktív konformációban találhatóak és aktivitásukat több tényező szabályozza. A BCL2 család antiapoptotikus tagjainak kötődése gátolhatja a működésüket, míg a BCL2 család proapoptikus tagjai, illetve az aktív BAX és BAK transz-autoaktivációja vezethet a pórusképzéshez [6].



A pórusképző tagok mellett a BCL-2 család további tagjai is proapoptotikus funkciójú fehérjék. Az aktivátorok (pl, tBid, PUMA, BIM) közvetlenül is kapcsolódhatnak a BAX és BAK fehérjékhez, ami konformáció változást okozva elősegíti azok aktivációját. A szenzitizáló tagok (például BAD, BMF, BIK) elsősorban az anti-apoptotikus tagokhoz kapcsolódva felszabadítják a BAX és BAK fehérjét a gátlás alól. Az antiapoptotikus tagok (BCL2, BCL-XL, MCL1, A1, BCL-w) mennyiségi túlsúlya a sejt túlélését okozza. A proapoptotikus tagok akár az antiapoptotikus tagokhoz kötődve, akár a BAK és BAX molekulákat aktív konformációba hozva aktiválhatják azokat [2] (2. ábra).



**2. ábra. Az apoptózis mitokondriális útját a BCL-2 család pro és antiapoptotikus tagjainak egyensúlya szabályozza.** A mitokondrium membrán átjárhatóságát szabályozó BAK és BAX fehérjék aktivitása több lépésben kontrollált. Aktivitásuk fokozható egyes proapoptotikus tagok (BIM, BID) asszociációjával. Az antiapoptotikus tagok ugyanakkor gátolhatják akár a BAX-BAK, akár az aktivátor komponensek működését. A BCL-2 család proapoptotikus, szenzitizáló tagjai hatásukat elsősorban az antiapoptotikus tagok gátlásán keresztül fejtik ki. A folyamatban szereplő komponensek aktivitása komplex transzkripciós és posztranszkripciós szabályozás alatt áll, amelyeket túlélő és stressz jelek egyensúlya határoz meg [7].

A különböző stressz szignálok jellemzően néhány, meghatározott proapoptotikus tag mennyiségének növekedését indukálják, így például az UV sugárzás a BIM és BMF, míg a hipoxia a PUMA, NOXA és BNIP3 fehérjék termelődését serkenti [8]. Ugyanakkor a különböző túlélő jelek, szöveti növekedés faktorok egyes antiapoptotikus tagok átírását fokozzák, például az agy fejlődését a termelő BCL-2 teszi lehetővé [7], míg a csontvelői IL-7 az MCL1 mennyiségét növelve biztosítja a fejlődő limfociták túlélését [9]. A pro és antiapoptotikus tagok mennyisége elsősorban transzkripciós szinten szabályozott [10]. Például a p53 a BAX, PUMA, NOXA fehérjék transzkripcióját aktiválja, míg a BCL-2-ét gátolja, ezzel szemben a klasszikus NFκB aktiváció a BCL-2 gének átírását aktiválja. A termelődött pro és antiapoptotikus tagok aktivitása posztranszlációs módosításokkal (foszforiláció, ubiquitináció, hasítás) és különböző kötődő partnerek által is finomszabályozható [11].

Az egyes anti- és proapoptotikus tagok interakciója részlegesen szabályozott, így például a BCL-2 nem kapcsolódik a Hrk, vagy NOXA fehérjékkel, de a többi proapoptotikus taggal igen [7]. Amennyiben

különböző stressz szignálok (akár additív) eredményeként, vagy a túlélő jelek gyengülése következtében a proapoptikus tagok mennyisége meghaladja az antiapoptikus tagok mennyiségét a sejt apoptózissal elhal [12]. A fenti szabályozott folyamatok alhalmazaként beszélhetünk programozott sejthalálról. Szövet és életkor specifikusan az egyes sejttípusok élettartama, az egyes sejtek elhalásának ideje meghatározott, amelyet jellemzően bizonyos proapoptikus tagok mennyiségének programozott növekedése, (esetenként egyes antiapoptikus tagok mennyiségének csökkenése) idéz elő [12]. A programozott sejthalál folyamatokat, így a sejtek féléletidejét az elérhető túlélő jelek mennyisége, illetve a sejtet érő stressz jelek összessége is befolyásolja.

Különböző kórképek kialakulása mögött az apoptózis szabályozásban bekövetkező elváltozások állnak. A stressz jelek túlzott fokozódása vagy a túlélő jelek hiánya különböző degeneratív betegségeket eredményezhet, míg a túlélő jelek kóros aktivitása autoimmunfolyamatokhoz, illetve tumorok kialakulásához vezethet.

## 2.3 Az apoptózis inhibitor proteinek és a SMAC

A citoplazmában található Apoptózis Inhibitor Proteinek családjának három tagja (IAP1, IAP2, XAIP) széleskörű szerepet játszik a sejthalál szabályozásában. Mindhárom fehérje ubiquitin ligáz funkciójú. A XAIP kötődése közvetlenül gátolja az aktív kaszpáz-9-et és az effektor kaszpázokat, a kaszpáz 3 és 7-et. Ezen kívül az IAP1 és IAP2 fehérjékhez hasonlóan ubiquitinálja a kaszpáz 3/7-et, serkentve azok proteaszómális lebontását [13]. Az IAP család tagjai nem a prokaspázokhoz, hanem a kaszpázok hasított, aktív alakjaihoz kapcsolódnak. Az IAP fehérjék mennyisége a sejten belül viszonylag állandó, mivel auto-ubiquitinációra is képesek, így mennyiségük növekedése degradációjuk fokozódásához vezet [14].

A mitokondrium külső membránjának átjárhatósága nem csak a citokróm c kiáramlását teszi lehetővé, de több más, a sejthalál folyamatok szabályozásában fontos molekula is kikerül a citoplazmába. A high temperature requirement protein A2 (HtrA2, vagy Omi) szerin proteáz legfontosabb működése, hogy a XIAP és IAP fehérjék általi gátlás alól felszabadítja a kaszpáz-9, 3 és 7 molekulákat [15]. A second mitochondria-derived activator of caspases (SMAC vagy DAIBLO) N terminális régiójában ugyanazzal az IAP kötő szekvenciával rendelkezik, mint az aktív kaszpázok és ezáltal a kaszpáz-IAP kapcsolat kompetíciós inhibitora, ezáltal felszabadítva a kaszpázokat a gátlás alól. Másrészt a kialakuló SMAC-IAP interakció ko-degradációt is okoz, mivel az IAP ubiquitin ligáz aktivitása mindkét kötődő partner, így az inhibitor ubiquitinációját és proteaszómális lebontását is indukálja [14].

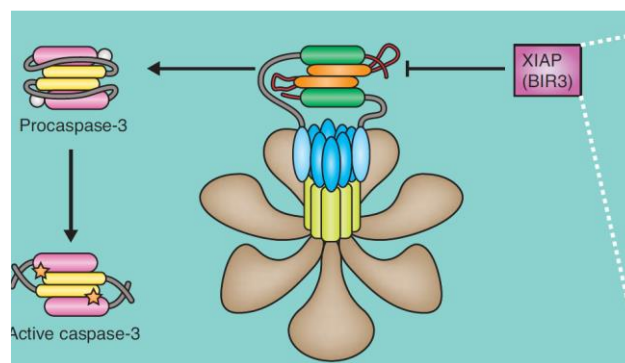
A SMAC-IAP kapcsolat kialakulásáért egy mindössze négy aminosav hosszúságú (AVPI) szekvencia a felelős. Az IAP antagonisták/SMAC mimetikumok kifejlesztése intenzív kutatások tárgya. A mimetikumok az AVPI szekvenciához hasonló térszerkezettel rendelkeznek, az IAP fehérjék kötőzsebébe illeszkedve a kaszpázok IAP kötődését gátolják és az IAP1 és IAP2 degradációjához is vezetnek. Egyes SMAC mimetikumok bár nem okozzák degradációját, a XIAP funkciót is képesek gátolni [16].

Míg a sejtben található IAP mennyisége általában elegendő a spontán kaszpáz aktiváció megakadályozásához, apoptotikus szignálokat követően azonban az aktív kaszpázok megnövekedett mennyisége, valamint a mitokondriumokból felszabaduló HtrA2 és SMAC kiáramlása az IAP-mediált gátlás feloldását eredményezi.

Az IAP fehérjék ubiquitin ligáz funkciója nem csak a proteozomális lebontást serkentő (K48) poliubiquitin lánc kialakulását indukálhatja, hanem fehérje-fehérje kapcsolatok kialakulását is elősegítheti (K-63 poliubiquitináció), így az NF $\kappa$ B jelpályán keresztül a sejt aktiváció fontos szabályozója is [17].

## 2.4 A kaszpáz-9

Nyugvó sejtekben az APAF-1 általában monomerként van jelen, inaktív, zárt konformációban, dATP-hez vagy ATP-hez kötve. A citokróm c kötődésekor az APAF-1 konformációs változáson megy keresztül (d)ATP hidrolízisével. Kialakul egy heptamer szerkezetű, kerékszerű apoptoszóma, amelyben a hét „küllőt” az APAF-1 molekulák alkotják, az ezekhez 1:1 arányban kötődő prokaspáz-9 enzimek „a kerék agyként” a komplex tetején helyezkednek el. A prokaspáz-9 CARD doménje szelektíven kötődik az Apaf-1 CARD doménjéhez homotípusos kölcsönhatás révén (**3. ábra**). Az apoptoszómához kötődő prokaspáz-9 konformációs változása és/vagy a megnövekedett lokális koncentrációja miatt jelentős katalitikus aktivitással rendelkezik, így a kaszpáz-9, a többi iniciátor kaszpáztól eltérően hasítatlan formájában is aktív lehet. A kaszpáz-9 autoproteolízist követően (D315), vagy a kaszpáz-3 által (D330) is hasadhat. Mindkét forma aktív proteázt eredményez [1].



**3. ábra.** Az apoptoszóma kialakulása a kaszpáz-3 aktiválódását eredményezi. A citokróm c kötődése az APAF-1 (barna-sárga) konformációváltozását és oligomerizációját eredményezi. A kaszpáz-9 kötődése a komplexhez aktiválja a proteázt, ami autoproteolízishez, majd a kaszpáz-3 hasításához vezet. A XIAP fehérje szelektíven csak a D315-nél elhasadt kaszpáz-9-et képes gátolni [18].

A kaszpáz-9 aktivitása adaptor proteinek kötődésével (XIAP, TUCAN, HAX-1) és poszttranszlációs módosításokkal is szabályozott. Számos szerin-treonin kináz (például ERK2, p38MAPK, AKT, CK2, PKA) képes gátolni a kaszpáz-9-et, míg az ABL-1 általi foszforiláció aktiválja [19]. Ismert, hogy a kaszpáz-9 nem csak az apoptózisban vesz részt, de például szerepet játszik a monocita differenciációban, axon degenerációban, autofágiában is [18].

## 2.5 Extrinszik, sejthalál receptor-mediált apoptózis:

A sejthalál receptorok konstitutív expressziója ellenőrző funkciót biztosít az immunrendszer számára, lehetővé téve szinte bármely testi sejt elpusztítását. Az immunválasz során termelődő sejthalál ligandumok (a TRAIL egyes szöveti sejtek általi termelődése is ismert) receptoraikhoz kapcsolódva keresztkötik azokat és így elindítják a sejthalál folyamatokat. Míg a Fas és a TRAIL receptorok a legtöbb sejten kifejeződnek, a TNF receptor expressziója az immunrendszer bizonyos sejtjeire jellemző [20].

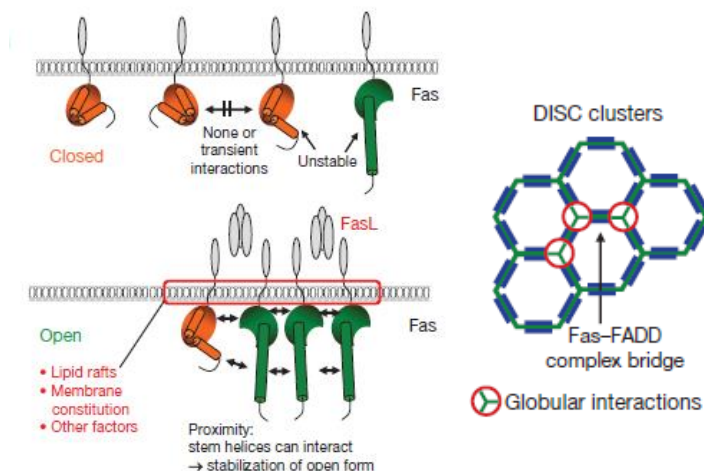
A sejthalál indukáló komplex (Death Inducing Signaling Complex, DISC) kialakulásakor a FADD adapter fehérje kapcsolódik a receptorhoz, majd ezt követően, a kaszpáz-8 iniciátor kaszpáz kötődik a komplexhez, aktiválódik és ez az apoptotikus kaszkád beindulásához vezet [21].

A Fas receptorok a TNF család receptoraira jellemzően trimerekbe rendeződnek már a ligand kötést megelőzően is, a receptorok extracelluláris részén elhelyezkedő preligand assembly doménjeik (PLAD) interakcióinak köszönhetően. A ligand bekötődése a már meglévő trimerek oligomerizációjához vezet [21]. Ennek megfelelően ismert, hogy a FasL monomerek nem képesek a receptor aktivációját kiváltani, a kötőhelyek elfoglalásával inkább kompetitív inhibitoroként viselkednek [21].

A Fas-FADD interakció ligand kötés hiányában spontán apoptózis kialakulását indukálná. A Fas alapállapotban zárt konformációban található, DD doménje a FADD számára nem hozzáférhető. A nyitott konformáció instabil, a DD-nek csak a receptorok nagyon kis részén, minimális ideig elérhetőek. A ligand kötését követően a trimerek asszociációjának hatására a receptor citoplazmatikus szakasza nyitott állapotba kerül, ami lehetővé teszi a FADD DD doménjének csatlakozását. A FADD kötődése egyrészt stabilizálja a nyitott konformációt, másrészt a receptorhoz asszociálódott FADD DED-doménjein keresztül egy újabb FADD molekulához kötődhet (**4. ábra**). Ennek eredményeként kialakuló FADD-FADD kapcsolat intracellulárisan biztosítja a Fas trimerek kapcsolódását és ezáltal stabilizálja a FasL által extracellulárisan egyben tartott receptor komplexet. A kaszpáz-8 DED homológ domén interakción keresztül szintén FADD DED doménjéhez asszociálódik, 1:1 sztöchiometrikus arányban [21]. A kaszpáz-8/FADD kapcsolat a FADD/FADD interakcióra megközelítően mérőlegesen helyezkedik el [22]. A FasL által kiváltott receptor oligomerizáció nemcsak növeli a nyitott konformációban levő receptorok mennyiségét, de mivel a nagyobb méretű aggregátumok stabilabbak, a ligand mennyiség arányában fokozza a jel elindulásának valószínűségét is.

A FADD-hoz kapcsolódó prokaspáz-8 molekulák rendelkeznek minimális enzimaktivitással. Az éppen aktív konformációban lévő prokaspáz-8 transz-autoproteolízissel képes hasítani a térben közelében elhelyezkedő prokaspáz-8 molekulákat. A nem kívánt, ligand hiányában kialakuló, spontán jel iniciálódását az is nehezíti, hogy a kaszpáz-8 dimerként aktív, így egy –véletlenszerűen bekövetkező– hasítás nem eredményez hatékony proteázt [23]. A nagyméretű FasL-Fas-FADD-prokaspáz-8 aggregátumok több prokaspáz-8-at tartalmaznak és stabilitásuknak megfelelően hosszabb ideig tartják egymás közelében az enzimeként és szubsztrátként is résztvevő prokaspáz-8 molekulákat, mint a

kisméretű komplexek. Az aktív állapotú kaszpáz-8 dimer létrejötte a jelpálya gyors aktivitásához vezet, mivel az aggregátumban levő prokaspáz-8 molekulák hasítása robbanásszerűen felgyorsul.



**4. ábra. A FasL kötődése és a Fas-FADD kapcsolat együttműködése vezet Fas receptor oligomerizációjához.** Ligand hiányában a Fas receptor citoplazmatikus szakasza inaktív, zárt konformációban található, ligand kötést követően azonban nyitott konformációba kerülhet, ami lehetővé teszi a FADD bekötődését. A FasL a sejtfelszínen a FADD-FADD dimerek létrejötte pedig a citoplazma felől biztosítja a Fas trimerek összeköttetését és a komplex stabilitását [21].

A jelátviteli út kezdeti, finoman szabályozott lépéseit követően az aktív kaszpáz-8 dimerek egy újabb hasítási lépésnek köszönhetően leválnak a receptor által összeszerelt komplexről és a citoplazmába kerülve aktiválják az effektor kaszpázokat. Az úgynevezett egyes típusú sejtekben a kaszpáz-8 aktivitása az apoptózis kialakulásához elegendő kaszpáz-3 hasítását indukálja. A kettes típusú sejtekben a BID proapoptotikus fehérje kaszpáz-8 általi hasítása a mitokondriális útvonal beindulását eredményezi, ami ezen sejtekben feltétlen szükséges az apoptózishoz [24].

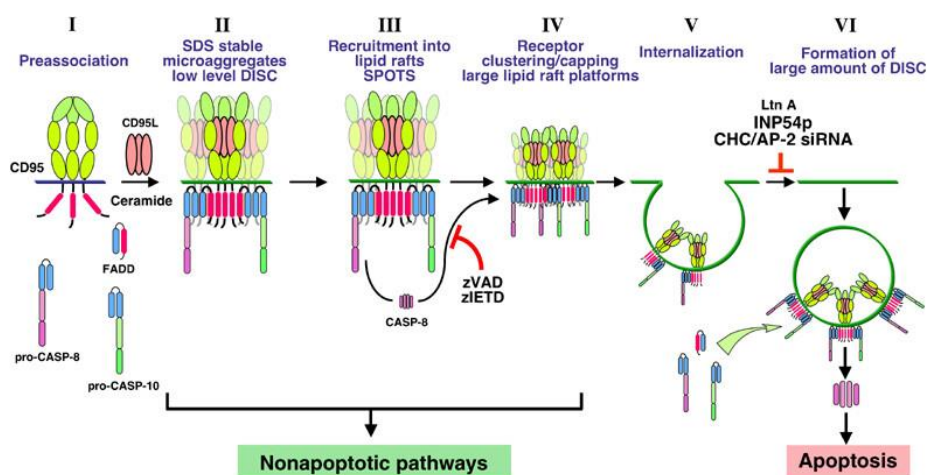
A sejthalál receptor indukált apoptózis folyamata szinte minden lépésében gátolható. A jelpálya downstream szakaszát felügyelő BCL-2 család anti-apoptotikus tagjait, illetve az IAP család fehérjéinek szerepét már említettük. A receptor ligandum kapcsolatát egyrészt a ligand monomerek/trimerek kötődése gátolhatja, másrészt úgynevezett csalétek (decoy) receptorok is expresszálódhatnak, amelyek ligandkötő képessége megegyezik a sejthalál receptorokéval, de nem tartalmaznak aktív jelátviteli régiót, általában DD domént [25]. A 'valódi' és a csalétek receptorok aránya befolyásolja a receptor által összeszerelt komplex méretét, stabilitását.

A kaszpáz-8 specifikus gátlói a FLIP molekulák, a (FLIP(L), FLIP(S) és FLIP(R)), amelyek a kaszpáz-8 paralógjaiként a kaszpáz-8-cal megegyező DED-tartalmazznak, képesek a FADD-hoz és a prokaspáz-8-hoz is kapcsolódni. A FLIP(L) a pszeudokaspáz doménjében megfigyelhető néhány aminosav eltérés miatt nem rendelkezik katalitikus aktivitással, míg a FLIP(S) és a FLIP(R)-ben a teljes pszeudokaspáz domén hiányzik [23]. (A FLIP(R)-t eredetileg Raji sejtekben írták le, expressziója korlátozott, leginkább T sejtekben jellemző [23]) Míg a FLIP(S) egyértelműen a kaszpáz-8 kompetitív inhibitora, a FLIP(L)

szerepe komplexebb. A prokaspáz-8/FLIP(L) komplexe a kaspáz komponens aktivitását eredményezheti, ami alkalmas lehet a környezetében található prokaspáz-8 molekulák hasítására [23] (Magas FLIP(L) koncentráció azonban a prokaspáz-8 molekulák térbeli közelségét akadályozza.) A prokaspáz-8/FLIP(L) komplexe limitált szubsztrát specificitással rendelkezik a prokaspáz-8 dimerekhez képest, alkalmas azonban például a RIPK1 hasítására [26].

Az előzőekben bemutattuk a Fas receptor aggregációjának szerepét a jelátvitel elindulásában. Ennek tükrében belátható, hogy a receptorok sejtmembránban történő mozgásának szabályozása jelentősen befolyásolja a Fas-indukált apoptózist. A Fas membrán raft lokalizációja, a Fas-citoszkeleton kapcsolat, és a Fas endocitózisa egyaránt intenzíven vizsgált terület. A Fas raftokban való elhelyezkedésének gátlása jelentősen csökkentette a FasL által kiváltott apoptózist [27]. A Fas citoszkeletonhoz történő horgonyzását az ERM családba tartozó ezrin adapter fehérje biztosítja, ennek csendesítése gátolta a Fas-indukált apoptózist T sejteken [28]. A DISC komponenseinek Fas receptorhoz való toborzása túlnyomórészt azt követően következik be, hogy a receptor endoszómális kompartmentbe kerül, ennek megfelelően kimutatták, hogy a CD95 internalizációja is szükséges az optimális DISC képződéshez és az apoptózishoz (5. ábra).

A Fas receptor (pl. lpr egerek) vagy a Fas ligand (gld egerek) funkciójának hiánya egéértörzsekben az immunrendszer működési zavaraihoz vezet, mint a lymphadenopathia, splenomegalia, hyperimmunoglobulinémia, glomerulonephritis, valamint fokozódik a B limfómák kialakulásának valószínűsége is [29]. Hasonló jelenségeket figyeltek meg az emberi autoimmun limfoproliferatív szindrómában [30], ami a Fas molekulák, vagy a Fas-közvetített jelátvitelben szereplő molekulák különféle mutációi révén alakul ki [31], [32].



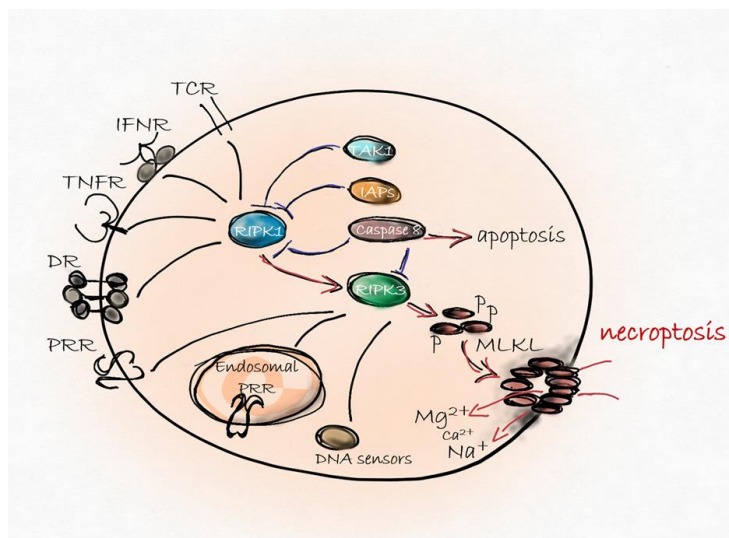
**5. ábra.** A sejthalál indukáló komplex az endoszómában aktiválódik. A Fas oligomerizációját követően lipid raftokba lokalizálódik, majd a receptor-citoszkeleton kapcsolaton keresztül, melyet az ERM fehérjék szabályoznak, endocitózissal a sejt belsejébe kerül. A ligand és az oligomerizált receptor komplexe az endoszóma membránban aktiválja az apoptoikus szignálokat [33].

## 2.6 Nekroptózis

A nekroptózis egy szabályozott sejthalál folyamat, amely azonban az apoptózissal szemben a membrán integritás elvesztésével, a sejt szétesésével és az ezt követő DAMP felszabadulással jár, így gyulladás indukáló folyamat [34]. Alapvetően az apoptózis tartalék mechanizmusának tartják, amely biztosítja a veszélyessé vált sejtek eltávolítását az apoptózis programjának meghibásodása esetén is.

### 2.6.1 A sejthalál receptor indukált nekroptózis jelátvitelének vázlatos összefoglalása

Különböző farmakológiai ágensek mellett a sejthalál receptorok és bizonyos mintázatfelismerő receptorok válhatnak ki nekroptózist. A sejthalál receptor indukált nekroptózis során a RIPK1 DD-je kapcsolódik a FADD DD-jéhez. Ezt követően kialakul a RIPK1-RIPK3 interakció, a két molekula (RIPK homológ interakciós motívum) RHIM motívumainak összekapcsolódásával. A RIPK3 overexpressziója önmagában is nekroptózishoz vezet, így a RIPK1 elsődleges szerepe a RIPK3 receptor komplexhez horgonyzása, oligomerizációjának elősegítése. A RIPK1-RIPK3 komplexben mindkét komponens foszforilálódik. Az aktivált RIPK3 ezt követően az MLKL molekulákat is foszforilálja, ami az MLKL konformáció változását idéz elő. A nyitott konformációba kerülő MLKL oligomerizálódik, majd a sejtmembránba lokalizálódik és ott kisméretű pórusokat képez. A nekroptózist kation beáramlás és ezt követő ozmotikus sokk jellemzi. A kationok részben az MLKL formált pórusokon részben az MLKL által szabályozott kalcium csatornákon keresztül juthatnak a sejtbe [34] (6. ábra).



**6. ábra.** A nekroptózis jelátvitelének legfontosabb komponensei. A nekroptózist kiváltó stimulusok közül legjobban a sejthalál és mintázatfelismerő receptorok által indukált jelpályák karakterizáltak. A sejthalál receptorok a RIPK1 által összeszerelt molekuláris komplexen keresztül a RIPK3, majd az MLKL aktiválásához vezetnek, ami a sejtmembrán integritás elvesztését eredményezi. Némely mintázatfelismerő receptor a RIPK3 közvetlen megkötésével aktiválja a nekroptotikus sejthalált. A nekroptózis legfontosabb gátlói az NFκB transzkripciós faktor aktiválásán keresztül sejt túlélést serkentő szignál komponensek, mint a IAP-ek, vagy a TAK1 kináz, valamint az extrinszik apoptotikus útvonal iniciátor kaspáza a kaspáz-8 [34].

Az apoptózis, mint a szervezet számára előnyös sejthalál forma dominanciáját a nekroptózis felett a kaspáz-8 apoptotikus aktiválódása biztosítja, amely hasítani képes a RIPK1 és RIPK3 molekulákat, ezáltal gátolva a nekroptózis kialakulását. Különböző intracelluláris kórokozók hatására, valamint egyes tumor típusokban megfigyelhető a kaspáz-8 gátlása az apoptózis elkerülése érdekében, ezzel azonban a sejt érzékennyé válik a nekroptózisra [35].

A RIPK1 nekroptózisban játszott szerepét a kaspáz-8 általi hasítás mellett ubiquitinációja is szabályozza. Az IAP-ek által mediált komplex folyamat eredményeként a RIPK1 poliubiquitinálódik, ami a TAB1/2-TAK1, illetve a IKK $\gamma$ -IKK $\alpha/\beta$  molekula komplexek összeszerelődését, interakcióját és ezen keresztül NF $\kappa$ B aktivációt és a sejt túlélését segíti elő [36]. A Cylindromatosis (CYLD) deubiquitináz fehérje aktivitásának következtében, vagy az IAP-ek hiányában a RIPK1 deubiquitinálódik, ami a túlélő jelek megszűnéséhez vezet, egyben lehetővé téve a RIPK1-mediált sejthalál folyamatokat, ami egyaránt vezethet kaspáz-8 függő apoptózishoz, vagy RIPK3 függő nekroptózishoz. A kaspáz-8 a RIP kinázokon kívül a CYLD-t is képes hasítani, ezáltal is gátolva a nekroptózist [37]. Kísérletes körülmények között a nekroptózis stimulálása *in vitro* és *in vivo* rendszerekben is kaspáz inhibitorok és IAP antagonistákat (SMAC mimetikumokat) együttes használatával történik.

Összességében a sejthalál receptorok négy féle jelpályát aktiválhatnak. (1) RIPK1 függő módon NF $\kappa$ B aktivációt és a sejt túlélését, (2) FADD-kaspáz-8 interakcióval apoptózist, (3) RIPK1-FADD-kaspáz-8 interakcióval apoptózist, illetve (4) RIPK1-RIPK3 függően nekroptózist [34]. A sejtet érő stimulusok összhangja, az aktivált sejt típusa, az intracellulárisan rendelkezésre álló molekulák mennyisége és aktivitása határozza meg, hogy melyik útvonal lesz domináns (**7. ábra**).

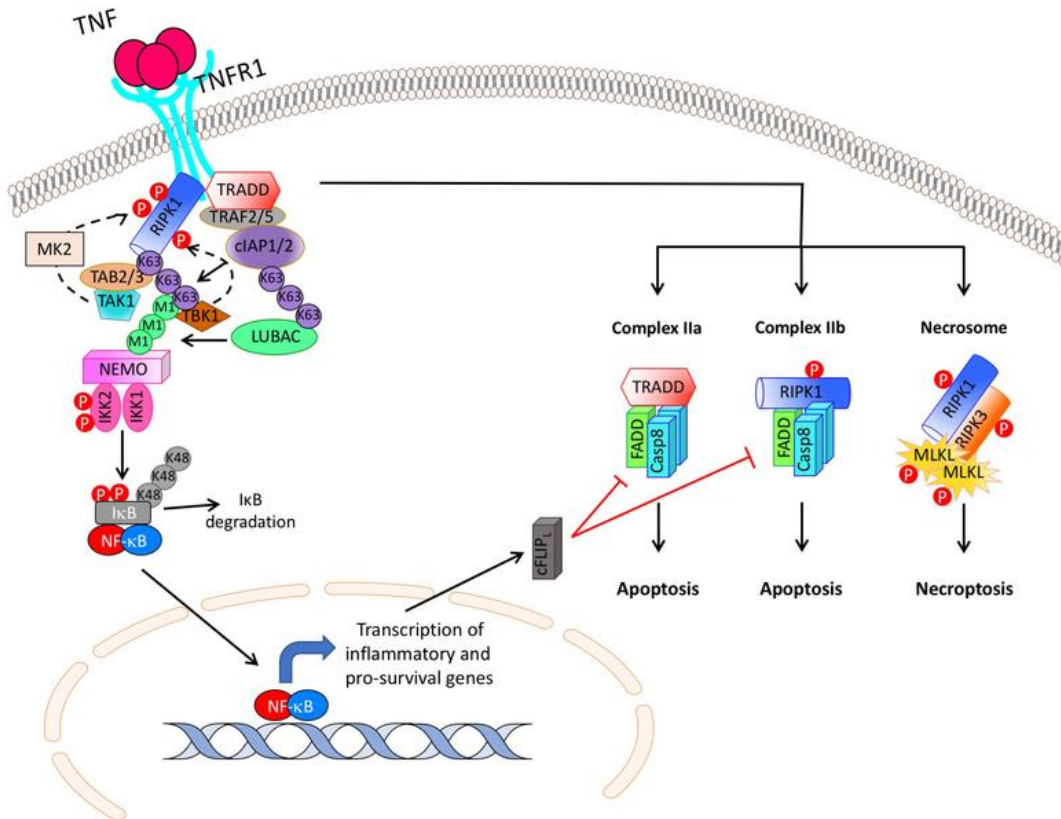
(A TNFR elsősorban NF $\kappa$ B aktivációt, míg a Fas receptor elsősorban FADD-kaspáz-8 függő apoptózist indukál, ezek gátlásakor történik átkapcsolás a jelpályák alternatíváira) A dolgozat szempontjából fontos megemlíteni, hogy míg a sejthalál receptor/kaspáz-8 interakciója a nekroptózissal rendkívül intenzíven tanulmányozott, a mitokondriális apoptózis/kaspáz-9 és a nekroptózis kapcsolatáról szinte semmilyen adat nem állt rendelkezésre.

## 2.6.2 Mintázatfelismerő receptorok által indukált nekroptózis

Egyes mintázatfelismerő receptorok aktivációja is nekroptózishoz vezethet [38]. A TLR3 és 4 receptorokhoz asszociálódó TRIF adaptor fehérje, valamint a DNS szenzor DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI vagy ZBP1) is rendelkezik RHIM motívummal. A RIPK3 RHIM motívuma kapcsolódhat ezen a receptorok RHIM motívumához. A receptorok ligand függő aggregációja így a RIPK3 oligomerizációjához és az ezt követő autofoszforilációjához vezethet, ami beindítja a nekroptotikus folyamatokat. Érdekes módon a RIPK1, amelynek RHIM motívuma szintén kapcsolódhat a receptorok RHIM motívumához, ebben a folyamatban kompetitív inhibitora RIPK3 kötődésének és így nekroptózissá [39]. A RIPK1 RHIM függő asszociációja a fenti receptorokhoz a



RIPK1 szabad DD-je miatt azonban lehetővé teszi a receptor-RIPK1-FADD-kaspáz-8 komplex kialakulását és így RIPK1 függő apoptotikus kaszkád aktivációját [39].



**7. ábra. A TNF receptor által aktiválódó jelpályák összefoglalása.** A TNFR négy eltérő jelátviteli utat aktiválhat a ligand bekötődését követően. A TNFR1 aktiválása az I. komplex kialakulásához vezet, a RIPK1 kináz és az Nemo adapter fehérjék ubiquitinációja lehetővé teszi, hogy az I $\kappa$ B aktiváló komplex tagjai és ezek kinázai egy molekula komplexbe kerüljenek, ami elősegítheti az NF $\kappa$ B aktiválódást, a sejtek túlélését és a gyulladós citokin termelést. Ezzel szemben az NF $\kappa$ B aktivációjának gátlása az extrinszik apoptotikus útvonal aktiválódását eredményezi (komplex IIa). A RIPK1 ubiquitinációjának hiánya a RIPK1 függő sejthalál útvonalakat, a RIPK1 mediált apoptózist (komplex IIb) és nekroptózist ((komplex IIc) eredményez (M1 és K63 poliubiquitin láncok, IKK, MK2, LUBAC, TAB1-2, TAK1, TBK1, TRAF) [40].

### 2.6.3 A nekroptózis szabályozása

A nekroptózis központi jelátviteli útvonalán szerepet játszó molekulák mindegyike többértű szabályozás alatt áll. A teljesség igénye nélkül, génexpressziós szinten a különböző szabályozó faktorok közül kiemelkedik az IFN-ok szerepe, amelyek a RIPK3 és az MLKL szintjét is növelhetik, így érzékenyítve a sejteket a nekroptózisra (egyes modellekben direkt módon nekroptózist indukálva) [41]. Posztranszlációs módosítások közül a RIPK1, RIPK3 és MLKL ubiquitinációja és a foszforilációja a legintenzívebben vizsgált. A különböző ubiquitin ligázok, valamint azok regulátorai befolyásolják a sejtek nekroptózis érzékenységét. A RIPK1, RIPK3 és MLKL fehérjék féléletideje mindhárom esetben (K48) ubiquitinációval szabályozott, ami lebontásukhoz vezethet. A K48-as ubiquitináció indukálásával

számos ligáz szerepét azonosították a nekroptózis szabályozójaként [34]. A RIPK1 fehérje interakciókat segítő (K63) ubiquitinációja szintén több molekula komplexen keresztül szabályozott. A RIPK1-et autofoszforilációján kívül az NF $\kappa$ B útvonalban szereplő több kináz is foszforilálja, ezáltal gátolva nekroptózist, biztosítva a sejtaktiváció dominanciáját a sejthalál szignál felett. Amennyiben az NF $\kappa$ B jelpálya ép a TNF receptor sejt aktivációt közvetít, ami együtt jár a nekroptózis gátlásával [42]. Munkánk során ezek közül a TAK1 inhibitorok használatával gátoltuk az NF $\kappa$ B aktivációt, ezáltal egyidejűleg felszabadítva a nekroptózist a TAK1 és más ezen az útvonalon downstream elhelyezkedő kinázok gátlásától.

A membrán repair mechanizmusok szabályozó funkciója egyre több sejthalál folyamat, így a nekroptózis esetében is ismertté vált. Az MLKL pórusokat tartalmazó membrán régió endocitózisa - az endosomal sorting complexes required for transport III machinery (ESCRT-III)- komplexével szabályozva-, illetve exocitózisa – ami ALIX-syntenin-1 mediált folyamat- a pórus képzést követően is megakadályozhatja a sejthalál kialakulását és egyaránt csökkenti a nekroptózis intenzitását [43],[44].

Több más interakciós partner mellett három olyan molekulát azonosítottak, amelyek nyugvó sejtekben is a RIPK1 és/vagy RIPK3 kötődő partnerei lehetnek. A Protein Phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> Dependent 1B-t (Ppm1b), az aurora kináz A-t (AURKA), és a HSP90-et. A Ppm1b foszfatáz megakadályozza a spontán nekroptózis kialakulását, gátolva a RIPK3 autofoszforilációját speciális stimulus hiányában [45]. Az AURKA a RIPK3-hoz kapcsolódva szubsztrátjával, a glikogén szintáz kináz 3 $\beta$ -val (GSK3 $\beta$ ) együtt limitálja a RIPK1-RIPK3 és RIPK3-MLKL komplexek képződését [46]. Ezekkel szemben a HSP90–CDC37 komplex előzetes interakciója a RIPK1–RIPK3 molekulákkal elősegíti a nekroptózis aktiválódását [47].

A nekroptózis fiziológias szerepe kevésbé ismert. A RIPK3 vagy az MLKL hiánya nem okoz jelentős fenotípus változást (kutyafélékben, madarakban, erszényesekben egyáltalán nem is expresszálódik [48]). A nekroptózis túlműködése azonban több gyulladásos kórképben kimutatott, egyes knock out egerekben, negatív szabályozóinak hiányában (például a kaszpáz-8, FADD, vagy a RIPK1 ubiquitinációját irányító molekulák deficienciája esetén), a túl intenzív nekroptózis embrionális letalitást eredményez [49].

(A nekroptózis jeltávítelésének szabályozását, emberi kórképekben játszott szerepét egy összefoglaló közleményünkben részleteiben bemutattuk [34].)

## 2.7 A FAS-indukált sejthalál szerepe B sejteken

A B sejtek csontvelői érése, a sejtek féléletideje specifikus antigén hiányában nagyrészt a mitokondriális apoptózis jelpályáin keresztül szabályozott. A Bim proapoptotikus faktor mennyiségének növekedése sejthalál szignált, míg a citokinek (elsősorban az IL-7) és a BCR-mediált tonikus szignál a BCL-2 család A1 és Mcl-1 anti-apoptotikus tagjainak expresszióját fokozzák és ezen keresztül túlélő jeleket közvetítenek a fejlődő B sejteknek [9]. A perifériás immunválasz során az érett B sejtekben az antigén

felismerést követően jelentősen megnő az anti-apoptotikus fehérjék mennyisége, így az aktivált B sejtek kevésbé szenzitívek az intrinszik apoptózis aktiválódására [9]. Míg a nem-aktivált B sejteken minimális a Fas expresszió, ez jelentősen megemelkedik az antigén felismerést követően, ami egy új ellenőrzési lehetőséget biztosít az aktivált B sejtek mennyiségének szabályozásában [50]. A Fas-indukált apoptózis kontrolálása B sejtekben is elsősorban a FLIP fehérje mennyiségének szabályozásával történik [51].

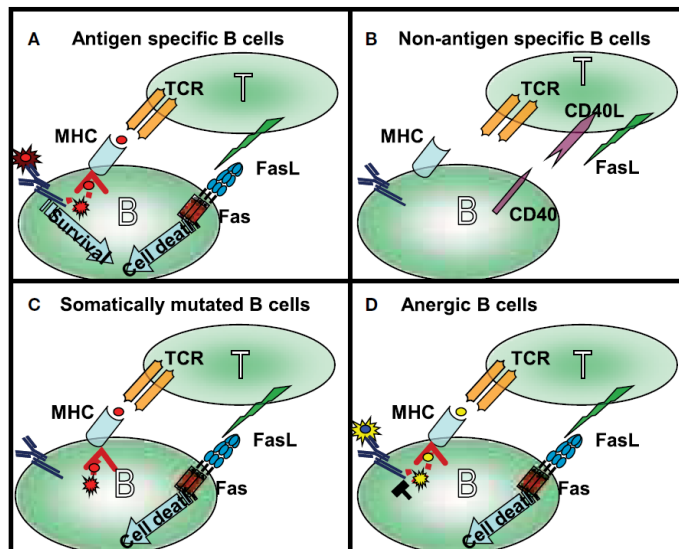
A Fas-mediált apoptózis szerepének fontosságát a B sejt aktiváció szabályozásában jól mutatja, hogy azokban az egerekben is splenomegalia fejlődött ki az életkor növekedésével, ahol a Fas expresszió kizárólag a B sejtekben hiányzott. (Azonban nem jelent meg az lpr egerekre jellemző a B220+ dupla negatív T sejt populáció [52],[53]). Ezekben az állatokban az IgM és IgG2a-t termelő autoreaktív B sejtek felhalmozódtak és megnövekedett a szérum antitest és autoantitest koncentrációja is, majd az ellenanyag szint megemelkedésének eredményeként vasculitis és glomerulonephritis alakult ki [52],[53]. Érdekes módon, amennyiben a B sejtek expresszálják a Fas receptort, de a T sejtek nem, a T sejteken többszörösére emelkedik a FasL mennyisége [54]. Mivel ilyen kondíciók között a T sejt szám is nő, ez összességében jelentősen növeli a T sejtek citotoxikus aktivitását. Ezekben az állatokban nem csak az autoantitestek títere csökken, de az antigén-specifikus válaszok szintén hiányoznak, még a másodlagos immunizálás után is [55]. Ezek a megfigyelések azt bizonyítják, hogy a Fas/FasL egyensúly pontos szabályozása elengedhetetlen a B sejt válasz során, túlműködése gátolja a B sejt választ, míg alul működése autoimmunitást okoz.

A csíráközpontokban kialakuló T sejt/B sejt interakció következtében jelentősen fokozódik az aktivált B sejteken a Fas expresszió, elsősorban CD40-CD40L-függő folyamat eredményeként [56],[57]. A Fas hiánya kizárólag a germinális centrum B sejteken hasonló tüneteket (magnövekedett ellenanyag szint, splenomegalia, lymphadenopathia) okoz, mint az lpr állatokban megfigyeltek, bizonyítva, hogy a Fas-mediált szabályozás legfőbb targetjei a GC B sejtek [58].

## 2.7.1 Túlélő szignálok és a Fas-indukált sejthalál együttműködése az antigén specifikus B sejtek szelekciójában

Az antigén felismerést követő sikeres antigénprezentáció intenzív T sejt/B sejt interakciót eredményez. A B sejtek kapcsolatba kerülése az aktivált, FasL-ot expresszáló T sejtekkel a B sejtek pusztulását eredményezi, amennyiben nem érkezik túlélő jel a B sejtek számára. A legintenzívebb túlélő szignált az antigén felismerés, a BCR specifikus aktivációja biztosítja [57], [50]. A FasL-indukált sejthalál ezért elsősorban azokat a B sejteket érinti, amelyek interakcióba lépnek a T sejtekkel, azaz prezentálják az antigént, de gyenge BCR szignalizációval rendelkeznek. Ezek a B sejtek lehetnek a kis affinitású sejtek, azok, amelyeknek a szomatikus mutáció során csökkent az affinitása, vagy az anergizált B sejtek, amelyeken a BCR degradálódott, vagy szignalizációja gátolt (**8. ábra**). Azt, hogy az antigénprezentáció meghatározó és szükséges lépés a folyamat során, bizonyítják azok a kísérletek, amelyekben kimutatták, hogy azok a B sejtek, amelyeket feltöltöttek a T-sejtek számára epitópként szereplő peptidekkel, így

antigénprezentáció zajlott, de a BCR közvetített túlélő jel nem érvényesült, specifikus T sejtek jelenlétében elpusztultak, azonban a peptidet nem tartalmazó B sejtek túléltek [59].

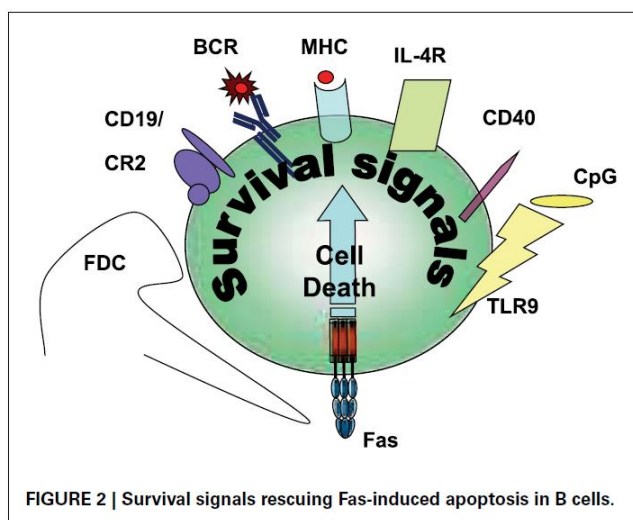


**8. ábra.** A csírközpontokban zajló antigénprezentáció során a kialakuló T sejt-B sejt interakció a FasL-Fas kapcsolódáshoz vezet. Az antigénprezentáló B sejtek Fas indukált sejthalála fontos szerepet játszik a nagy affinitású B sejtek szelekciójában, mivel a T sejteken expresszálandó FasL apoptózist indukál a B sejtekben BCR-mediált túlélő szignálok hiányában. A kisebb affinitású, vagy anergizált B sejtek antigénspecifikus receptora nem képes megfelelő szignalizációra, így az apoptotikus szignálok nem gátlódnak [50].

A BCR közvetített túlélőjelek mellett különböző koreceptorok, citokinek, illetve PRR szignálok is fokozhatják a B sejtek túlélését (9. ábra).

- Egyes, vitatott eredmények szerint a T sejtek számára a peptidet prezentáló MHCII molekulák reverz szignalizációval egyidejűleg növelik a B sejtek túlélését [60], [50].
- A CD19-ről ismert, hogy a BCR-rel együttműködve több nagyságrenddel csökkenti a B sejt aktivációhoz szükséges stimulus küszöbértékét. A CD19 a CD21 komplement receptor jelátvitelért felelős, azzal egy komplexet alkot. A C3d3 komplement faktor szinergisztikusan fokozza a BCR-mediált túlélő jeleket a Fas-indukált apoptotikus szignálokkal szemben. Növeli a FLIP és BCL-2 expressziót [61]. Tovább erősíti ezt a megfigyelést, hogy CD21 hiányos egerekben jelentősen fokozódott a B sejtek Fas-függő apoptózisa [62].
- Nem antigén specifikus szignálok is gátolhatják a Fas-indukált apoptózist. A CD40 amellet, hogy indukálja a B sejteken a Fas expressziót, rövid távú (pár napos) túlélő jelet is biztosít, csökkentve a kaszpáz-8 és fokozva az anti-apoptotikus a FLIP, BCL-x1 és A1 expressziót a B sejtekben [63].
- A CD40 által közvetített túlélő jelet az IL-4 jelenléte szinergisztikusan megnöveli, feltehetően a BCL-x1 expresszió fokozásával [64].

- A legfontosabb adhéziós molekula párok gátlása, a B sejt/T sejt interakció gyengítésével, szintén csökkenti a Fas-indukált sejthalált [56].
- A B sejtek számára az antigént bemutató follikuláris dendritikus sejtek (FDC) jelenléte gátolja a B sejtek Fas-indukált sejthalálát, eddig még pontosan nem ismert mechanizmusokon keresztül [65].
- A hipometilált CpG motívumokat felismerő TLR9, nem ismert mechanizmussal, csökkenti a B sejtek Fas-indukált apoptózisát, azonban ez a hatás nem bizonyult additívnak a BCR-közvetített túlélő jellel [56].



**9. ábra. A Fas mediált sejthalál szignálok hatása B sejteken.** Az antigén specifikus receptorok ezek koreceptora (CD19), a T sejtek interakcióba kerülő receptorok (MHCII, CD40) a mikro környezet felől érkező jelek (FDC, IL4) vagy akár a kórokozók (TLR9 ligand CpG) jelenléte is túlélőjeleket közvetíthet módosítva a Fas-indukált apoptózis intenzitását [50].

### 2.7.2 A BAFF szerepe a B sejtek életképességének szabályozásában

A B-cell activating factor (BAFF) egy, az érett marginális zóna és B2 B sejtek, valamint egyes memória B sejtek túlélését támogató citokin [66]. Három receptor is képes a BAFF megkötésére, a BAFFR, a transmembrane activator and Ca<sup>2+</sup> modulator (CAML) interactor (TACI) és a B cell maturation antigen (BCMA). (A TACI és a BCMA ezen felül megköti az A proliferation-inducing ligand-ot (APRIL) is.) Mivel a BAFF, vagy BAFFR deléciója az érett B sejt szám jelentősen csökkenéséhez vezet, a fentiek közül legfontosabb szerepe a BAFF-BAFFR interakciónak van [67]. A plazmasejtek túléléséhez azonban elsősorban a BCMA receptor szükséges, amelyet akár a BAFF, akár az APRIL aktiválhat. A BAFF-ot és APRIL-t monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, follikuláris dendritikus sejtek, csontvelő-sztrómasejtek és T-sejtek is termelhetik. Ismert, hogy mindkét ligandum expressziója fokozódik gyulladásos körülmények között [68]. A természetes immunrendszer sejtjeinek aktiválódása így közvetlenül hatással lehet a B sejt szám alakulására.

Mivel a BAFF nem antigén-specifikus szignált indukál, a BAFF-BAFFR interakció fokozza az autoimmun B sejtek túlélését is. Kimutatták, hogy a BAFF szintje számos autoimmun betegségben megemelkedett, így szisztémás lupus erythematosus-ban (SLE), Sjörgen-szindrómában vagy rheumatoid arthritisben. A belimumab, egy BAFF-ellenes antitest aktív SLE-ben és aktív lupus nephritis-ben engedélyezett szer, ahol használata a B sejt szám csökkenését eredményezi [66]. A BAFF szerepet játszik B sejt limfómák kialakulásában és a sejthalál indukáló kezelések elleni rezisztencia fenntartásában is [66].

### 2.7.3 A TLR9 szerepe a B sejtek életképességének szabályozásában

A TLR9 egy a nem metilált CpG oligodeoxynucleotidokat (ODN) felismerő receptor. Elsősorban a prokariótákra jellemző metilálatlan/kevésbé metilált DNS felismerését követően aktiválódik, azonban nagy koncentrációban a saját DNS is aktiválhatja, ezért egyes autoimmun betegségek kialakulásában, fenntartásában is szerepet játszik. Emberben a plazmacitoid denritikus sejtek mellett elsősorban B sejteken jelenik meg, ahol jellemzően az endolizoszomális kompartmentbe kerülő DNS aktiválhatja [69].

A CpG ODN általi stimuláció önmagában is B sejt proliferációhoz vezethet, ami elsősorban memória B sejtekre jellemző, ezáltal a CpG részt vesz a memória és az antitest termelés fenntartásában [70]. Azonban a TLR9 legfőbb szerepe a BCR-indukált jelpályákkal együttműködve kialakított B sejt aktivációban van. Az antigén-specifikus B sejtek patogén felismerését, de ugyanígy a haldokló vagy sérült sejtekből felszabaduló autoantigének felismerését követően is a BCR egy belső endo-lizoszomális kompartmentbe szállítja az antigént. Itt a lizoszomális endonukleázok a TLR9 számára ideális DNS fragmentumokat hasíthatnak [71]. A TLR9 ezt követően már hatékonyan kapcsolódhat a DNS-hez, a TLR9 és a BCR egyidejű stimulálása pedig jelentősen felerősíti a B sejt választ [72]. A TLR9 közvetített jelek így csökkenthetik az antigén-specifikus B sejtek aktiválódási küszöbét, ami különösen hatékony a DNS felismerő (jellemzően autoreaktív) B sejtek klónok aktivációjában. Ennek megfelelően a TLR9 szerepe jól ismert a nukleáris antigének elleni autoimmun válaszreakciók kialakulásában [73].

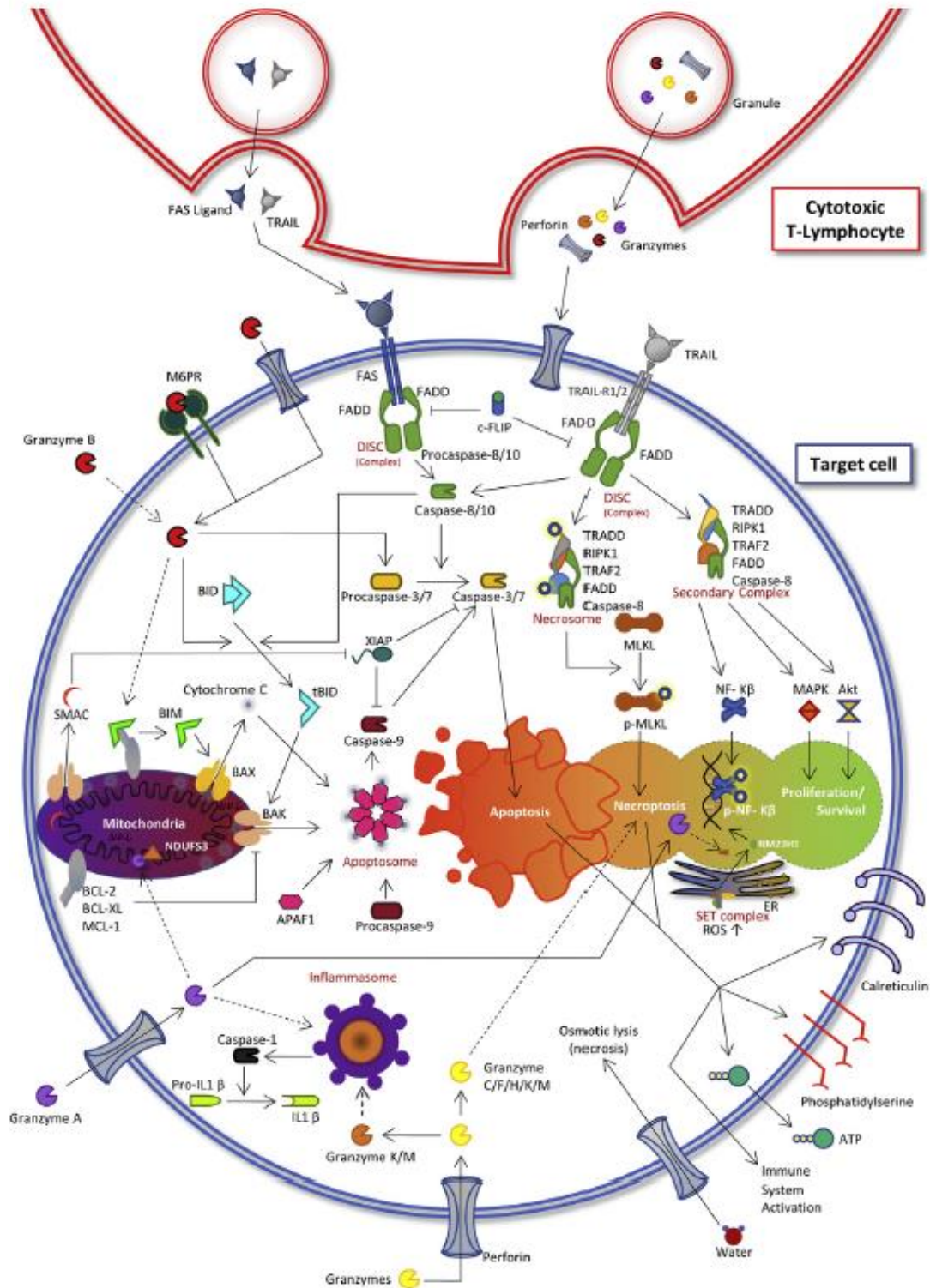
TLR9 hiányában nem alakul ki anti-DNS ellenanyagtermelés különböző egér lupus modellekben és ismert, hogy rheumatoid arthritisben és szisztémás lupus erythematosusban szenvedő betegek apoptotikus T-sejtjeinek DNS-e demetilált az egészséges kontrollokhoz képest [74]. Meglepő módon azonban, a TLR9 hiánya ennek ellenére súlyosbította az SLE tüneteit. Az SLE-ben megfigyelt védő hatás pontos mechanizmusa még nem ismert, de biztos, hogy ez a hatás is a B sejteken expresszálandó TLR-9-hez kapcsolható [75].

A TLR9 és a Fas receptorok interakcióját B sejteken már tanulmányozták. Kimutatták, hogy a nem metilált CpG motívumok jelenléte megvédte a B sejteket a Fas-indukált apoptózistól. A TLR9 által közvetített túlélő szignálok hatásmechanizmusa azonban még nem pontosan ismert [76].

## 2.8 A sejthalál receptorok szerepe az immunrendszer citotoxikus funkcióiban

A T sejtek citotoxikus funkcióinak két jól elkülöníthető szerepe van, meghatározóak a fertőzött vagy tumoros sejtek eliminálásában és részt vesznek az aktivált T sejtek eltávolításában is. A T sejt-mediált sejthalál folyamatok a perforin-granzim útvonal, vagy a sejt felszíni sejthalál receptorok aktiválásán keresztül történhetnek (**10. ábra**). A perforin-granzim rendszer aktivációja során a citotoxikus T sejtek a specifikus antigénreceptorokkal felismert célsejt felé szekretálják a vezikulumokban tárolt, előre elkészített mediátorokat. A perforin pórusképző fehérje lehetővé teszi a granzimek bejutását a citoszolba [77], bár egyes eredmények szerint önmagában is lehet sejtölő funkciója [78]. A granzimek szerin proteázok, melyeknek ismert direkt baktérium ölő funkciója is, valamint gátolják a vírus replikációt is. E mellett a célsejtbe jutva sejthalált is indukálhatnak kaszpáz függő, a kaszpáz független és ROS függő módokon egyaránt. A család tagjai közül a granzim A és B szerepe a leginkább tanulmányozott CTL-ekben. [79]. A granzim B az apoptózis indukció során direkt módon aktiválhatja a kaszpáz-3-at, de a Bid proapoptotikus fehérje hasításán keresztül a mitokondriális útvonalra is hatással van. Immunológiai szempontból fontos megemlíteni, hogy a granzim A és B dupla knock out állatokban bár a citotoxikus T sejtek ölő képessége megmaradt (bár a target sejtek kevésbé és némileg kisebb intenzitással pusztultak el), az így kiváltott sejthalál nem vezetett keresztprezentációhoz, mivel a DC-ek az így elhalt sejteket kevésbé fagocitálták [80]. Ez rávilágít arra, hogy a CTL-indukált folyamatok – granzim függő módon – erősen immunogén sejthalált eredményeznek.

Ezzel egyidejűleg az aktivált CTL sejtek felszínén megjelenő sejthalál receptorok ligandjai (TNF, TRAIL FasL) interakcióba léphetnek a célsejtek felszínén expresszálandó receptoraikkal, melyek közül az aktiváció indukált sejthalál folyamataiban elsősorban a FasL-Fas interakció játszik szerepet. A sejthalál ligandumok szekretált formái is ismertek, a sejt felszínről enzimatis hasítást követően leválhatnak, de vezikuláris formában is kikerülhetnek a citotoxikus sejtekből. A szolubilis, szekretált FasL nem képes a Fas receptor megfelelő intenzitású keresztkötésére, így a bár a receptorokhoz kapcsolódik, nem aktiválja azokat, hanem kompetitív inhibitorként viselkedik [81], [82]. Ezzel szemben a sejt felszíni FasL a CTL/célsejt kapcsolat során oligomerizálódik, ami Fas aktivációját és a target sejt sejthalálát indukálja. Irodalmi adatok alapján ismert, hogy PHA aktiváció hatására a CTL felülúszójában percekben belül funkcionáló FasL jelenik meg, aminek szekréciója nem igényel fehérjeszintézist [83]. Ennek megfelelően kimutatták, hogy a FasL mikrovezikulumokban, 50-200nm-es struktúrákban is szekretálódhat és ez vezikuláris FasL forma is citotoxikus hatású, aktiválhatja a sejt felszíni Fas receptorokat [84],[85]. Érdekes lehetőség, hogy a FasL a célsejtbe jutva is kifejtheti a hatását a sejtmembrán és a vezikulum összeolvadását követően.



**10. ábra. A citotoxikus T sejtek ölő funkciói.** Az aktivált T sejtekből felszabaduló perforin/granzime rendszer és a sejtfelszínen expresszált, vagy a szekretált sejthalál ligandumok egyaránt a célsejt pusztulását okozzák. A sejtfelszíni sejthalál receptorok aktivációja extrinszik apoptózist, a sejtbe kerülő proteázok az intrinszik apoptotikus útvonalat aktiválják a célsejtekben. Az apoptotikus jelpályákkal egyidejűleg nekrotikus sejthalál szignálok is bekapcsolhatnak, ami biztosítja a target sejt elölését anti-apoptotikus szignálok jelenlétében is [77].



## 2.9 Makrofág alpopulációk immunológiai szerepe

A makrofágok az immunrendszer első védelmi vonalát alkotó multifunkcionális sejtek. Szerepük a veszély szignálok felismerése, a kórokozók eliminálása, a természetes és az adaptív immunrendszer aktiválása, részt vesznek az elhalt sejtek eltakarításában és a szövet regenerációban is. Szinte minden emberi szövetben megtalálhatóak, ahol immunológiai működésük mellett szövetspecifikus funkciókat is ellátnak. Rendkívül plasztikus sejtek, sokféle altípusukat osztályozhatjuk eredetük, szöveti lokalizációjuk, vagy funkciójuk szerint is. A különböző makrofág altípusokon belül két jól elkülöníthető funkcionális szélsőség létezik: a klasszikus proinflammatorikus M1 és az alternatív antiinflammatorikus, szövet regenerációt irányító M2 alpopulációk. A két véglet közt számos funkcionális és fenotípusos különbségeket mutató makrofág alcsoportot írtak le [86].

Az M1 makrofágok gyulladás indukáló, antimikrobiális és daganatellenes tulajdonságokat mutatnak. Jellemzőjük a CD80, CD86 fokozott expressziója és az immunstimuláló citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23) szekréciója. Az M1 sejtek kemokinek széles skáláját is termelik, amelyek elősegítik az NK sejtek, CD4+ Th1 sejtek és CD8+ T limfociták aktivációját és proliferációját. Az alternatív M2 makrofágok CD163, CD206 és CD209 markerek jelenléte alapján azonosíthatók. Az M2 sejtek egyaránt képesek gyulladást (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-12) és gyulladásgátló (IL-10, TGF $\beta$ ) citokinek termelésére, hozzájárulva a homeosztázis helyreállításához. Intenzív fagocitáló kapacitást mutatnak, részt vesznek extracelluláris mátrix komponensek, angiogén és kemotaktikus faktorok és különféle citokinek előállításában. A kórokozók elleni védekezésben betöltött szerepük mellett részt vesznek az apoptotikus sejtek eltávolításában, a gyulladástos válaszok elnyomásában, a sebgyógyulás és a szöveti regeneráció elősegítésében és a tumornövekedés elősegítő funkcióik is ismertek (**11. ábra**).

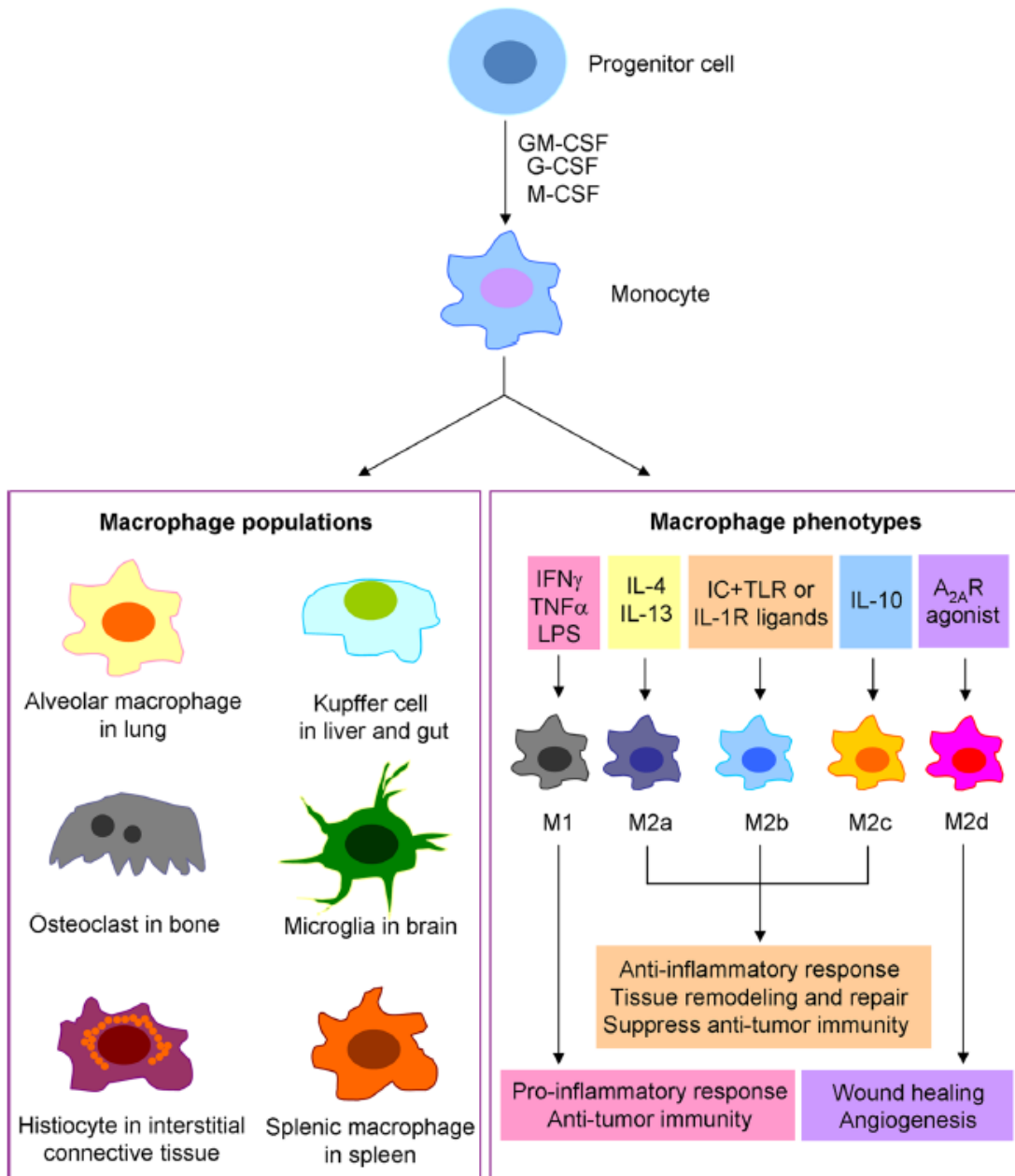
A különböző makrofág altípusok szekvenciálisan működhetnek, így például a gyulladás során jellemzően az M1 túlsúlytól az M2 dominancia felé halad a differenciációjuk. Az adott szöveti környezetben egyidejűleg többféle makrofág alosztály is aktív lehet, ilyenkor az altípusok relatív aránya határozza meg a funkcionális kimenetelt, például a gyulladás és a szövet regeneráció közötti egyensúlyt [87].

A tumorok immunelkerülő mechanizmusának általános lépése a makrofágok manipulálása. Ennek eredményeként a tumorok mikro környezetében jellemzően tumor asszociált makrofágok (TAM) alakulnak ki, amelyek tumor promótáló hatásúak, immunszuppresszívek, segítik az angiogenezist és növekedési faktorokat termelnek. A tumorok által befolyásolt makrofágok szerepe nem csak az adott mikro környezetben jelentős, de segíthetik a metasztázisok kialakulását is [88]. Az M1/M2 átmenet célzott modulálása ígéretes stratégiákat kínálhat különféle betegségek gyógyítására.

Ennek megfelelően folyamatban lévő klinikai vizsgálatok zajlanak az M1/M2 egyensúly módosítására például rák [88], atherosclerosis [89], sclerosis multiplex [90] vagy endometriózis [91] esetén. Az alkalmazott megközelítések elsősorban a makrofág altípusok differenciációjának, vagy kemotaktikus viselkedésének szabályozását célozzák [92]. Az egyes makrofág alpopulációk célzott deléciója

specifikus sejthalál stimulusokkal, bár szintén terápiás lehetőséget jelenthet, jelenleg kevésbé intenzíven vizsgált.

A makrofágok hosszú életű sejttypusként viszonylag ellenállóak az apoptózissal szemben [93], de érzékenyek a nem apoptotikus sejthalál formákra, így a ferroptózisra, piroptózisra és a nekroptózisra is [94]. A SMAC mimetikumokról ismert, hogy önmagukban adva is sejthalált váltanak ki makrofágokban, különösen kaspáz-kompromittált körülmények között [95], és a TAK1-inhibitorokról is kimutatták, hogy nekroptózist és piroptózist is indukálnak makrofágokban [96].



**11. ábra** Az *in vitro* differenciált és polarizált M1 és M2 makrofágok főbb jellemzői. Mindegyik fenotípus kialakulhat bizonyos induktorok hatására: így az M1populáció LPS és/vagy IFN- $\gamma$  hatására, az M2a IL4/IL13 jelenlétében, az M2b immunkomplexekre adott válaszként; az M2c IL-10 vagy TGF- $\beta$ , míg az M2d IL6 és adenzin jelenlétében [86].

## 2.10 A dendritikus sejtek szerepe az immunválasz citotoxikus funkcióinak szabályozásában

A dendritikus sejtek (DC-k) az immunválasz legkorábban aktiválódó sejtjei közé tartoznak és kapcsolatot biztosítanak a veleszületett és az adaptív immunitás között. Az éretlen DC-ek (iDC) észlelik és fagocitják a bekerülő kórokozókat a perifériás szövetekben. Az aktiválás után az iDC-ek miközben érett DC-ekké (mDC) differenciálódnak, elhagyják a fertőzés helyét, és a nyirokcsomókba vándorolnak, ahol a fagocitált kórokozókból származó peptid fragmentumokat mutatják be a naiv T-sejteknek [97]. Extracelluláris kórokozók esetén a DC-k aktivációját és a patogén felvételét is sejtfelszíni mintázatfelismerő receptorok stimulációja váltja ki. Intracelluláris kórokozók, illetve tumorok esetében azonban a DC-k antigén felvétele, majd prezentációja, csak a kórokozó, vagy tumor antigén közvetlen DC-be kerülését követően lehetséges. Az élő emberi sejtek bekebelezése erősen gátolt, így bármely egyéb, nem DC-t fertőző patogén, vagy a tumorantigének csak az adott sejt elpusztulását követő efferocitózis során kerülhetnek be a DC-kbe. Ennek hatására a DC-k intracelluláris mintázatfelismerő receptorai aktiválódnak, ami a DC-k migrációját és a felvett antigének keresztprezentálását indukálja. A folyamat során a fagocitált antigének MHC I és MHC II molekulákon keresztül egyidejűleg (kereszt)prezentálódnak, lehetővé téve a naiv citotoxikus T sejtek aktivációját is [98].

A DC-ek az antigén nyirokcsomókba szállítása mellett az immunválasz irányításában is jelentős szereppel bírnak. Egyrészt a másodlagos immunszervekben a DC-k által termelt citokinek meghatározóak a T sejt polarizáció szabályozásában, másrészt a perifériás szövetekben elhelyezkedő DC-k a lokális immunválasz regulátorai. A szöveti DC-k erősen plasztikus sejtek, eredetük alapján is osztályozhatóak, valamint a környezeti stimulusoktól függően eltérő funkciójú altípusokká is differenciálódhatnak. A tolerogén DC-k a regulátor T sejtek differenciációjának indukálásával, immunszuppresszív citokinek termelésével az immuntolerancia központi szabályozói. A glükokortikoidok immunszuppresszív hatása többek közt, hogy modulálják a DC differenciálódását, érését, valamint működését és csökkentik a DC-k keresztprezentációs képességét [99]. Ezzel szemben immunstimuláló citokinek jelenlétében, elsősorban IFN-ok hatására, a DC-ek aktivált fenotípusú sejtekké differenciálódhatnak. Ezeken a DC-ken fokozódik az MHC és a kostimuláló molekulák expressziója, ami fokozza a CD4<sup>+</sup> T-sejtek [100] és a keresztprezentáció révén a CD8<sup>+</sup> T-sejtek aktivációját is [101].

### 2.10.1 A dendritikus sejtek szerepe a tumor regulált immunreakciókban

A makrofágok mellett a DC-k is komponensei a tumorkörnyezetnek, különböző tumorok esetében is leírtak infiltráló DC-eket. A DC-k alapvető tumor ellenes funkciója a környezetből származó antigének összegyűjtése és feldolgozása, így az elhalt tumorsejtekből származó peptidok keresztprezentációja a naiv citotoxikus T-sejtek számára. Ezen kívül a DC-k az effektor T-limfocitákra hatva is elősegíthetik

gazdaszervezet védekezését a tumor progressziójától. Azonban a tumorsejtek általi közvetlen, vagy indirekt hatások a DC-eket is manipulálhatják. Ily módon a rosszindulatú sejtek elnémítják a DC által közvetített T-sejt aktivációt, miközben elősegítik a regulátor T-sejtek DC-függő differenciálódását, ezáltal a DC-k immunszuppressziót is okozhatnak. A tumor környezetben található DC-k befolyásolhatják az immunterápiára adott válaszokat is [102].

## 2.10.2 A dendritikus sejtek citotoxikus funkciói

A keresztprezentáció első lépése a fertőzött, vagy tumoros sejt pusztulása, ami bekövetkezhet spontán módon, a fertőzés/tumor növekedés hatására, de az immunreakciók következtében is. Primer immunizálásnál az effektor citotoxikus T sejtek funkcióit még nem vehetjük számításba, az NK sejtek pedig a MHC I normális expressziója mellett csökkent aktivásúak lehetnek. Az aktív sejtpusztító mechanizmusok hiánya a keresztprezentáció és a naiv T sejt aktiváció késlekedésével járhat. A DC-k antigén felvétele nem teljesen passzív folyamat. Kimutatták, hogy a DC-k citotoxikus tulajdonsággal is rendelkeznek ([103], [104], [105]). Habár a DC-k sejthalál indukciójának pontos funkciója még nem ismert, valószínűleg ez a képességük a keresztprezentáció felgyorsításra irányul, a fertőzött sejtek mielőbbi bekebelezését lehetővé téve. Kimutatták, hogy a DC-k citotoxikus képessége a szövetekben lokalizált éretlen DC-kre jellemző ([106], [104]), amely különböző aktivációs szignálok, így vírusinfekció [107], PRR aktiváció, például duplaszárú RNS [103], vagy LPS [108],[109], koreceptorok, mint CD40L [103], [109] hatására alakul ki. Mind az aktivált DC-ek felülűszójjával történt kezelés hatására, mind sejt-sejt kontaktust követően leírták a DC-ek citotoxikus funkcióját ([108]). A TNF ([103], [109],[110]), a FASL [110], és a TRAIL ([103], [107], [110]) ligandumok szerepe egyaránt bizonyított a DC-indukált sejthalál folyamataiban.

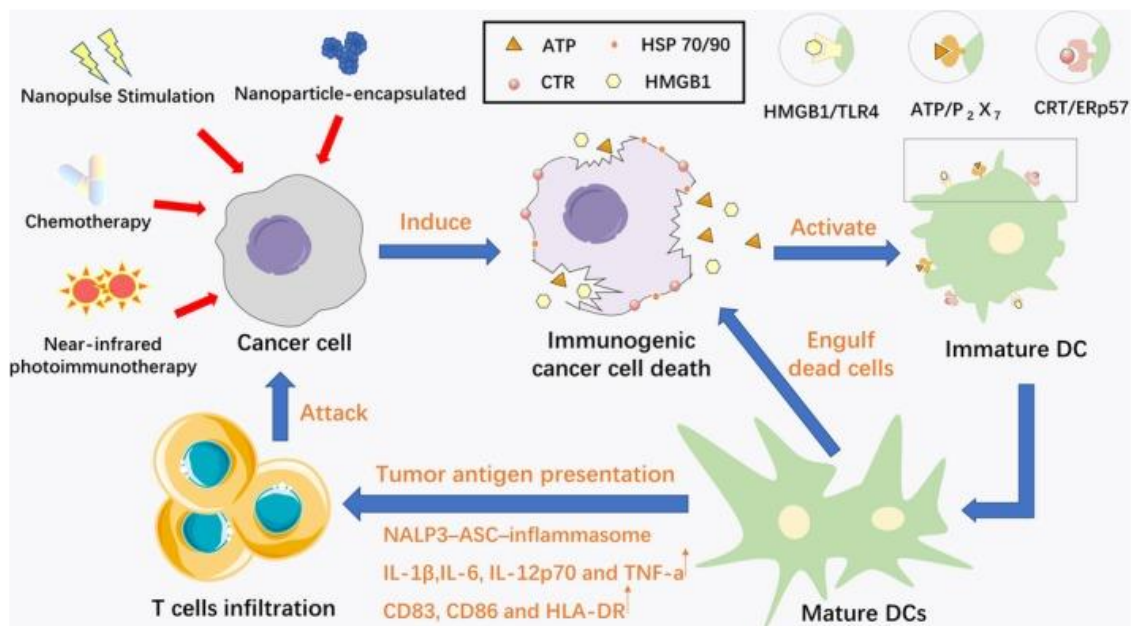
## 2.11 Az immunogén sejthalál

A sejthalál folyamatok során felszabaduló anyagok egyaránt hathatnak a természetes és az adaptív immunrendszerre. Régóta elkülönítik az immunológiailag csendes (esetleg szupresszív/tolerogén) és a gyulladást indukáló sejthalál formákat. Ez a felosztás elsősorban a természetes immunrendszert reakcióra vonatkozott ([111]). Az utolsó évtizedben vezették be az immunogén sejthalál (ICD) kifejezést, amely olyan sejthalál folyamatot jelöl, amely az adaptív immunrendszer aktivációját (a naiv T sejt aktivációt) eredményezi [112]. (Az adaptív immunrendszert gátló – tolerogén - és a természetes immunrendszert gátló – szupresszív – sejthalál formák elkülönítése még nem elfogadott [113]).

Az ICD egy olyan regulált sejthalál, amely elégséges, ahhoz, hogy aktiválja az adaptív immunrendszer válaszait egy immunkompetens szervezetben. A sejt ilyen esetben úgy hal el, ami segíti a DC-k fagocitózist, másodlagos nyirokszervekbe történő migrációját és a fagocitált antigének MHC I-en keresztüli prezentációját. Ennek előfeltétele az antigenitás, az adjuváns hatás, a DC keresztprezentációs képessége, és a támogató mikrokönyezet. A fertőzött sejtek, valamint a daganat sejtek

elendő *antigenitást* mutatnak az immunválasz kiváltására, mivel olyan epitópotokat expresszálnak, amelyekre általában rendelkezésre állnak specifikus naiv T-sejt klónok. Az *adjuváns* hatás eléréséhez összességében az elhaló sejtekből származó DAMP-ok felszabadulása szükséges, ami elengedhetetlen az antigénprezentáló sejtek toborzásában és érésében. ([114]) Több DAMP köthető ahhoz, hogy egy szabályozott sejthalál folyamat immunogén választ okozzon, ilyenek a calreticulin (CALR), ATP, high-mobility group box 1 (HMGB1), és annexin A1 (ANXA1). (egyes adatok szerint szükséges lehet a CLEC9A is). Az I-es típusú IFN-ok termelődése nagymértékben fokozza a DC-k *keresztprezentáló* képességét, mivel ennek a citokinnek elsődleges szerepe, hogy intracelluláris kórokozók jelenlétében aktiválja az immunválaszt ([114]) (12. ábra).

A tumor terápia során indukált immunogén sejthalál, a T sejt válasz aktivációján keresztül jelentősen fokozhatja a terápia sikerességét. Ismert, hogy az ICD-t többféle kemoterápiás szer használatával és különféle eszközös beavatkozásokkal ki lehet váltani. Fontos, hogy az alkalmazott dózisonak és alkalmazási menetrendnek is nagy szerepe van ezen ágensek ICD indukáló hatásában. A különböző kezelések optimalizálása az ICD kiváltásához intenzív kutatások tárgyát képezik jelenleg többféle tumortípusok esetén is [114].



**12. ábra** Az immunogén sejthalál egymást követő lépései. Az immunogén sejthalál fontossága elsősorban a tumor terápiában vált hangsúlyossá. Különböző kezelések megfelelő dózisban és kinetikában alkalmazva a tumorsejtek immunogén sejthalálát indukálhatják. Az elhaló sejtekből felszabaduló DAMP-ok, calreticulin (CALR), ATP, high-mobility group box 1 (HMGB1), hő sokk fehérjék (HSP) az éretlen DC-k aktivációját indukálhatják. Az elpusztult sejtek bekebelezését követően az aktiválódott DC-k a nyirokcsomóba szállítják és ott keresztprezentációval bemutatják a tumorantigéneket a naiv T sejteknek. A klonális osztódást és differenciációt követően létrejövő T sejtek az eredeti tumor és esetleg annak metasztázisai ellen is intenzív immunválaszt generálhatnak [115].

### 3 CÉLKITŰZÉSEK

Kutatómunkánkban az immunrendszerben zajló sejthalál folyamatok különböző aspektusait tanulmányoztuk.

Magvas sejtjeink szinte mindegyikén expresszáldók sejthalál receptor, elsősorban a FAS receptor, ami biztosítja az immunrendszer folyamatos kontrollját.

Vizsgálni kívántuk, hogy

- a Fas-mediált jelátvitelt milyen reverzibilis mechanizmusok szabályozzák
- az antigén specifikus B sejtekre ható különböző túlélőjelek, hogyan befolyásolják a Fas-indukált sejthalált
- a citotoxikus T sejtek Fas-függő funkciói milyen sejthalált indukálnak
- a DC-k antigén felvételében intracelluláris kórokozók esetén szerepet játszik-e a sejthalál receptor indukált sejthalál

A sejthalál receptorok mellett a kórokozók felismerése mintázatfelismerő receptorokkal is a sejt pusztulásához vezethet. A két sejthalált indukáló receptorcsalád együttműködéséről kevés adat áll rendelkezésre.

Vizsgálni kívántuk,

- a TLR receptorok és a sejthalál receptorok ko-aktivációjának hatását

Az elmúlt évtizedekben több szabályozott nem apoptotikus sejthalál formát is leírtak, köztük a gyulladással járó nekroptózist, amelyet sejthalál és mintázatfelismerő receptorok aktivációja is indukál.

Vizsgálni kívántuk,

- a sejthalál receptorok és a mintázatfelismerő receptorok indukálta nekroptózis interakcióját az apoptózissal

A tumor mikro környezetében kialakuló immunválasz iránya, a sejt típusok összetétele meghatározó a tumor fejlődése szempontjából. A citotoxikus terápiák nemcsak a tumorra hatnak, hanem annak mikro környezetére is, így befolyásolják az immunkomponensek arányát működését.

Vizsgálni kívántuk, hogy

- milyen sejthalál stimulusokkal befolyásolható a tumorok immunkörnyezete, a pro és antiinflammatorikus makrofág altípusok aránya
- a jelenleg alkalmazott citotoxikus kemoterápiás szerek hogyan módosítják a tumorok immunkörnyezetét

## 4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Célkitűzéseink megválaszolásához alkalmazott legfontosabb módszerek rövid ismertetése. A módszerek részletes leírása, a használt ellenanyagok, specifikus reagensek specifikációja a dolgozathoz csatolt közleményekben található.

### 4.1 Felhasznált sejttípusok

Kísérleteinkhez A20 (egér B sejt limfóma), BL41 (humán Burkitt limfóma), humán B-sejtvonalakat: HT58, Daudi, WSU, BL41, Ramos, BJAB, SKW6.4, humán T-sejtvonalakat: vad típusú és RIP1 deficiens SVT35 Jurkat; vad típusú és FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo, Fas deficiens és Fas deficiens, de Fas-sal újratranszfektált Jurkat Rapo; JA3 Jurkat és FADD, kaszpáz-8, kaszpáz-9 negatív szubklónjai, kaszpáz-9 deficiens, de kaszpáz-9-cel retranszfektált JA3 Jurkat, MEF (egér embrionális fibroblaszt), MEF-C9 (kaspáz-9 negatív MEF), HEK 293FT (SV40 T antigénnel transzformált HEK 293 T humán embrionális vesesejt), WSU (humán B-limfocita) és WSU-FasL (Fas ligandot expresszáló WSU) sejtvonalakat használtunk. Az eddig felsorolt sejtvonalakon kívül Ficoll-lal történő centrifugálással (2000rpm, 20 perc) izoláltunk friss mandulából limfocitákat és humán PBMC-t. A hat napos PBMC-t 1 napig 2 µg/ml PHA-val, 6 napig 2ng/ml IL-2-vel stimuláltuk, miközben 48 óránként cseréltük a médiumot. A MEF és MEF-C9 sejteket tenyésztő flaskákban DMEM low glucose médiumban tenyésztettük, a HEK 293FT sejteket DMEM high glucose, míg a többi sejtvonalat RPMI (médiumban tartottuk 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 100%-os relatív páratartalom mellett. Az egér sejtvonalak médiuma 50 µM merkaptóetenolt is tartalmazott. Minden sejtenyésztő tápfolyadékot a felsoroltokon kívül még 10% foetális borjú szérummal, 292 mg/l L-glutaminnal és 40 mg/l gentamicinnel egészítettük ki.

*Monocita szeparálás humán vérkészítményből, a humán makrofágok és Dendritikus sejtek differenciálása*

Egészséges véradóktól heparinizált buffy coat-ot kaptunk az Országos Vérellátó Szolgálat és a Regionális és Intézményi Igazgatóság, valamint a Debreceni Egyetem, Orvostudományi Kar Kutatásetikai Bizottságának írásbeli jóváhagyásával. A véradóktól hozzájárulása adataik feldolgozása és tárolása az Európai Unió irányelveinek megfelelően történt. A perifériás vér mononukleáris sejteit (PBMC) Ficoll-Paque Plus gradiens centrifugálással választottuk el a buffy coat-tól. A monociták PBMC-ből történő tisztítása pozitív szelekcióval történt immunmágneses sejtleválasztással anti-CD14-konjugált mikrogöngyök használatával. Az elválasztás után a sejtek 96-99%-a CD14+ monocitának bizonyult, áramlási citometriával mérve. Az izolált monocitákat 1,5x10<sup>6</sup> sejt/ml koncentrációban szérummentes AIM-V tápközegben szélesztettük. A DC-ek vagy makrofágok differenciáltatása érdekében 100 ng/ml IL-4-et és 80 ng/ml GM-CSF-et, vagy 50 ng/ml M-CSF-et adtunk a sejtekhez, az izolálás napján. A differenciálódási folyamat 2. napján sejttípustól függően 100 ng/ml IL-4-gyel és 80 ng/ml GM-CSF-fel vagy 50 ng/ml M-CSF-fel kiegészített tápközeg térfogatának felét frissítettük.

## *Makrofág és dendritikus sejt alpopulációk előállítása*

Az M-CSF jelenlétében differenciálódott monocitákból a differenciálódás ötödik napján 24 órán át 50 ng/ml ultratiszta lipopoliszachariddal, 20 ng/ml IFN $\gamma$ -val stimuláltuk, hogy M1-et és 20 ng/ml IL-4-gyel), 20 ng/ml IL-10-zel és 20 ng/ml TGF $\beta$ -val, hogy M2 fenotípust kapjunk. A sejteket a 6. napon tekintettük M1 és M2 altípusoknak.

A TAM-szerű sejtek differenciáltatásához az izolált monocitákat 5 napig 6 lyukú szövettenyésztő lemezen tartottuk  $2,0 \times 10^6$  sejt/ml sejtsűrűségben, Thp-1 felülűszóban, melyet IL-4-gyel (20 ng/ml), IL-10-el (20 ng/ml) és TGF $\beta$ -val (20 ng/ml) egészítettünk ki. Az 5. napon a TAM-szerű sejteket ismét Thp-1 felülűszóval kezeltük 24 órán át. A makrofágokat a 6. napon tekintettük TAM-szerű sejteknek.

Ismert, hogy a dexametazon a prezentáló sejteket tolerogén dendritikus sejtekké alakítja, amelyek T-sejt-gátló funkcióval rendelkeznek [116]. A dexametazon DC-eket (dexDC-eket) előállításához az izolált monocitákat 100 ng/ml IL-4-gyel, 0,25  $\mu$ M dexametazonnal és 80 ng/ml GM-CSF-fel tenyésztettük 5 napig. Az IFN-moDC-k előállításához az izolált monocitákat 5 napon keresztül 1000 U/ml rhIFN- $\alpha$  és 40 ng/ml GM-CSF jelenlétében tenyésztettük.

A kemoterápiás szereket, a Cisplatint, az Oxaliplatint, a Doxorubicint és az Epirubicint a jelölt koncentrációkban közvetlenül a monocita izolálása után és a differenciálódási folyamat második napján adtuk a sejtenyészethez.

## *Az M1 és M2 makrofágok ko-kultúrában való tenyésztése*

Az M1 és M2 sejtek közötti sejthalálintenzitás különbségek funkcionális jelentőségének tesztelésére makrofág ko-kultúrát hoztunk létre. Egyenlő számú M1 és M2 makrofágot ( $4 \times 10^5$  sejt/0,5 ml) együtt tenyésztettünk 4 órán át 24-lyukú sejtenyészítő lemezeken. Az M1 és M2 kokultúrát nekroptotikus stimulusokkal kezeltük. A túlélő makrofágokat anti-CD209-PE és anti-CD80-FITC antitestekkel jelöltük 24 órával a sejthalál indukciót követően. Az M1 és az M2 sejthalál megkülönböztetése érdekében az M2 makrofágokat CellTracker™ Green CMFDA festékkel töltöttük fel 37 °C-on 30 percig. Három intenzív mosási lépést követően  $4 \times 10^5$  sejt/0,5 ml M2 sejtet tenyésztettünk, azonos koncentrációjú, nem jelölt M1-vel, 24-lyukú sejtenyészítő lemezeken. Az M1 és M2 ko-kultúrát nekroptotikus ingerekkel kezeltük, a különböző populációk sejthalálát 24 óra elteltével PI festéssel határoztuk meg.

## *Érett és értelen B sejtek izolálása, aktiválása*

A kísérletekben 6/8 hetes BALB/c egereket használtunk. Az átmeneti éretlen B-sejtek előállításához az egereket 500 Rad-dal sugároztuk be és az autorekonstituált lépsejteket 14 nappal ezt követően izoláltuk. B-sejteket tisztításához a lépzet eltávolítottuk és a sejteket összegyűjtöttük. A vörösvérsejtek 5 ml Gey oldatban lizáltuk 1 percig. A megmaradó sejtek kétszer mostuk, és a szuszpenziót 20 percig szobahőmérsékleten kezeltük anti-Thy-1.2 antitestekkel. A sejteket nyúlkomplementet tartalmazó HBSS oldattal inkubáltuk 45 percig 37 °C-on. A HBSS-ben történő mosás után a sejteket centrifugáltuk



majd 50/75% Percoll gradienssel szeparáltuk. Az 50/75%-os határfelületen szétváló sejteket összegyűjtöttük és kétszer mossuk RPMI 1640 tápoldattal.

## *Egér B-limfociták izolálása és tisztítása*

A Vav1 hiányos egereket vagy kontroll B/57 egereket előzetesen 100 ml 1 mg/ml FITC-BSA-val injektáltuk 100 ml komplett Freund-adjuváns jelenlétében, majd 1 hét múlva a B-sejteket izoláltuk. A lépet eltávolítottuk, és a vörösvértestek lizáltuk, majd a fennmaradó sejteket mostuk és anti-Thy-1.2 Antitesttel kezeltük 30 percig szobahőmérsékleten. A nyúl komplementet tartalmazó RPMI médiummal inkubáltuk 30 percig 37C-on. A B-sejtek százalékos arányát áramlási citometriával elemeztük, fluoreszcensen jelölt anti-B220 és anti-CD3 ellenanyagokat használva.

## 4.2 Sejthalál mérése

### *Membrán integritás mérés*

A sejthalált a membrán integritás elvesztése és a propidium-jodid felvétele alapján számszerűsítettük (PI, Sigma-Aldrich). A sejteket PI oldattal (10 µg/ml PBS-ben) festettük, majd ezt a sejtpusztulást a fluoreszcencia intenzitás alapján Facs Calibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel határoztuk meg, az adatok kiértékelését pedig FlowJo szoftverrel (Tree Star) végeztük.

### *Sub-G1 mérés*

Az apoptózis következtében kialakuló DNS-fragmentációt sub-G1 mérés alapján határoztuk meg. A sejteket hideg 70 %-os alkoholban fixáltuk 1 órán keresztül, majd 38 mM-os citrát pufferrel (pH 7.4) mostuk. A sejteket 50 µg/ml PI-t tartalmazó 38 mM-os citrát pufferben jelöltük 15 percen keresztül 37 C°-on. A sub-G1 csúcsok arányát áramlási citométerrel határoztuk meg.

### *Effektor kaszpázok aktivációjának mérése*

A kaszpáz-3 és a kaszpáz-7 enzimaktivitásának méréséhez Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay kitet használtuk. A kísérlethez az előzetesen aktivált Jurkat sejtekből  $2 \times 10^4$  db-ot használtunk fel, melyeket mérés előtt 96 lyukú fekete színű sejtenyészítő platere helyeztünk. Az effektor kaszpázok aktivitásának detektálásához szükséges reakciókat a gyártó utasításainak megfelelően hajtottuk végre. A minták fluoreszcencia intenzitását Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader készülékkel mértük, melynek során  $485 \pm 20$  nm gerjesztési és  $528 \pm 20$  nm detektálási hullámhosszokat alkalmaztunk.

### *Életképesség meghatározása CCK8 assay módszerrel*

$2 \times 10^4$  db Jurkat sejtet kezeltünk 96 lyukú sejtenyészítő platen 24 órán keresztül. A sejtek életképességét Cell Counting Kit-8 (CCK8) módszerrel határoztuk meg a gyártó utasításainak megfelelően. Röviden: 100 µl sejt kultúrához 10 µl CCK8 reagenst adtunk, amiket ezt követően 4 órán keresztül termosztátban inkubáltunk. Az abszorbancia mértékét EnVision® 2105 multimode plate reader készülékkel mértük le 450 nm-es hullámhosszon. A kísérletek során a különféle kezelések esetén 4 párhuzamos mintával dolgoztunk és a sejtek életképességét (%) a kontroll mintákhoz viszonyítva adtuk meg.

## *Sejthalál indukálása*

Az áramlási citometriás mérések során mintánként  $5 \times 10^5$  db sejtet használtunk, melyeket a kísérlet időtartama alatt FACS csövekben (úszó sejtek esetén) vagy sejtenyésző plateken (letapadó sejteknél) tartottunk, a végső mintatérfogatot 500  $\mu$ l-re állítottuk be. A sejteket a megfelelő inhibitorokkal (10-50  $\mu$ M Z-VAD, 1  $\mu$ M BV6, 0,4  $\mu$ g/ml cycloheximide, 2,5  $\mu$ M CCT137690, 20  $\mu$ M AR-A014418, 40  $\mu$ M necrostatin-1, 1  $\mu$ M necrosulfonamide vagy 7,5  $\mu$ M GSK'872 illetve ezek kombinációival) 1 órát előkezeltük, majd a jelzett stimulusokkal sejthalált indukáltunk. A sejthalált 20-100 ng/ml anti-FLAG M2 antitesttel keresztkötött FasL-dal, 40 ng/ml anti-FLAG M2 antitesttel keresztkötött Trail-lel, 50 ng/ml humán TNF $\alpha$ -val, 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dal, 0,74-6,7  $\mu$ M ionomycinnel, 100 ng/ml LPS-sel aktiváltuk, human anti-Fas ellenanyaggal (CH11), SMAC mimetikummal (BV6, birinapant), TAK1 inhibitorral (5Z-7-oxozeaenol) különböző kemoteráias szerekekkel (doxorubicin, epirubicin, cisplatin, oxaliplatin) váltottuk ki, majd 24 órán múlva mértük a sejthalált. 100 ng/ml egér anti-Fas ellenanyaggal (JO2) történő kezelést követően 2 óra múlva mértük a sejthalált.

Kokultúrában a FasL-dal overexpresszált WSU B-sejtet reszuszpendáltunk CellTracker Green festékkel (5  $\mu$ M), majd 30 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. Ezután lecentrifugáltuk (10 perc, 1200 rpm), és friss médiummal 30 percre sejtenyésző termosztátba helyeztük, majd háromszor mostuk, végül a kívánt arányban a célsejthez adtuk. A két fajta sejtet 1 napig együtt inkubáltuk, majd a megfelelő kezeléseket követően a CellTracker negatív populációt áramlásos citométerrel vizsgáltuk.

A különböző sejtek citotoxicitásának vizsgálatához 4 millió/ml koncentrációjú FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejtvonalat, illetve PBMC-t stimuláltunk 100 $\mu$ g/ml PHA-val, vagy anti-CD3 plusz anti-CD28 ellenanyagokkal, vagy az iDC és mDC sejteket poli(I:C)-vel, CL075-tel, LPS-sel, 5 percen keresztül, majd a sejteket háromszor mostuk és végül friss médiumban vettük fel. 2 óra termosztátban történő inkubálás után összegyűjtöttük a felülúszót és a célsejtekhez adtuk, 24 óra elteltével mértük a sejthalált. Az aktivált T sejtek felülúszóját ultracentrifugálásnak vetettük alá. A 2 órás inkubációt követően a sejteket 15000 rpm-en 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd az így nyert felülúszót 70000 g-re 2 órára ultracentrifugába helyeztük. Az így kapott felülúszóval és 0,5 ml médiumban reszuszpendált pellettel stimuláltuk a célsejteket, indukáltunk sejthalált.

### 4.3 B sejt aktiváció mérése

A tisztított B sejteket 50 mg goat anti-mouse IgM (Fab')<sub>2</sub> fragmenttel 5 perccig 37 C-on aktiváltuk. majd 20 másodperces centrifugálást követően azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A sejtlizátumokat 0,5 ml lizispufferben készítettük el. 30 perc jégen történő lízist követően perc a sejtlizátumokat 15 000 /g-vel 20 perccig 4 °C-on centrifugáltuk és a felülúszókat használtuk a western blott, illetve immunprecipitáció során. Az immunprecipitációt proteinG gyöngyökhöz kötött anti-foszfotirozin (PY20), illetve Gab2 specifikus poliklonális ellenanyagokkal végeztük.

## koncz.gabor\_172\_24

### *Intracelluláris szabad $Ca^{2+}$ -szint mérés átfolyásos citofluorimetriás módszerrel*

5·10<sup>6</sup> BL41 sejtet 0,5 ml 10% FCS tartalmú RPMI 1640 médiumban 37°C-on 30 percig 5 µg fluo-3 AM fluoreszcens indikátor festékkel inkubáltuk, majd a sejteket mostuk 30 percig 37°C-on. Az így megfestett sejteket 10 percig 1200 rpm-mel centrifugáltuk, majd reszuszpendáltuk 10 ml 10% FCS tartalmú RPMI 1640 médiumban és 1 µg/ml 7 amino-aktinomicin D festékkel jelöltük a pusztult sejteket. A mintákhoz az aktiváló ellenanyagot a mérés elindítása után 20 másodperccel adtuk. A mérést FACSCalibur (Becton Dickinson, Amerikai Egyesült Államok) áramlási citofluoriméterrel végeztük

### *Fas receptor internalizációjának vizsgálata.*

Az SHP-1 shRNAi és kontroll shRNAi A20 sejteket inkubáltunk jégen 30 percig 200 ng/ml rekombináns Fas-dal, amit 1 mg/ml egér anti-Flag IgG Ab-val (M2) keresztkötöttünk, illetve kontrollként csak M2-vel A nem kötött FasL-ot mosással eltávolítottuk majd a sejteket 37 C-on a jelzett időtartamokra aktiváltuk, ami így szinkronizált Fas stimulációt vált ki. Az aktiválást jéghideg oldat a hozzáadásával állítottuk le. A sejteket ezután mostuk, és 30 percig jégen inkubáltuk FITC-konjugált JO2 anti-Fas ellenanyaggal. A Fas–FasL komplexek internalizációs fokának meghatározásához a háttér kontroll sejtek átlagos fluoreszcencia intenzitását (MFI) minden alkalommal kivontuk a FasL-dal aktivált sejtek MFI-jéből az MFI abszolút megszerzéséhez. A FasL stimulált sejtek MFI-jét elosztottuk a nem aktivált kontroll sejtek MFI-jével, hogy megkapjuk a sejt felszínen maradt Fas százalékos arányát.

### *Western blot*

A fehérjék kiszabadítását a sejtekből 2x Laemli pufferben való lizálással értük el. A fehérjéket SDS gélelektroforézissel választottuk el 10% poliakril-amid gélen, a fehérje mintákat a méret szerinti szeparálást követően nitrocellulóz membránra vittük át (Bio-Rad Laboratories). Az antitestek nem specifikus kötődését 5%-os tejjel (TBs-Tweenben oldva) blokkoltuk. A blokkolást követően a membránokat a jelzett antitestekkel inkubáltuk *overnight* 4 °C-on 500-2000x hígításban alkalmazva. Másodlagos ellenanyagként tormaperoxidázzal konjugált anti-nyúl, anti-egér, vagy anti-patkány antitesteket alkalmaztunk.

### *Fehérjeinterakciók vizsgálata immunprecipitációval*

A kísérlethez mintánként 5x10<sup>7</sup> sejtet használtunk fel, melyeket az aktivációt követően 1500 rpm-en 10 percig centrifugáltunk, majd a pelletet 500 µl 1% Triton X-et, proteázgátlót és foszfatázgátlót tartalmazó lízis pufferben lizáltuk jégen 30 percig. A mintákat ezt követően 10 percig 15000 rpm-en centrifugáltuk, majd megállapítottuk a fehérje koncentrációjukat. A mintákból azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó felülúszót mértünk az alábbi antitestekkel fedett protein A/G PLUS-agarose gyöngyökhöz, melyeket ezután 4 °C-on folyamatosan forgatva *overnight* inkubáltunk. Másnap a gyöngyöket négyszer mostuk lízis pufferrel, majd a szárazra szívott gyöngyökhöz 30 µl 2x Laemmli-féle minta puffert mértünk, majd 5 percig 95 °C-on főztük és ezt követően a mintákat azonnal felhasználtuk vagy pedig -20 °C-on tároltuk.

#### 4.4 Makrofág és dendritikus sejt funkciók vizsgálata

##### *ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)*

Az antigén-antitest kötődésen alapuló technika, első lépésként 96 lyukú plate-re az adott citokinre specifikus antitestet vittünk fel, amit 4 °C-on, egy éjszakán keresztül inkubáltunk, majd a nem kötött, főlegben alkalmazott reagenst PBS-Tween oldattal mostuk a plate-ről. A kikötött antitesthez a 10%-os FCS-sel hígított minta citokin tartalma kötődött. Ezt követően biotinnal konjugált, szintén a citokinre specifikus antitestet alkalmaztunk. Ehhez avidinnel konjugált torma-peroxidázt adtunk, TMB szubsztrát használatával. Az adott citokin koncentrációját a 450 nm-en mért abszorbancia-értékek alapján határoztuk meg. Az M1 és M2 makrofágok felülúszóit a differenciáltatás 6. napján gyűjtöttük össze és mértük az aktiválást követő 24 órával ELISA módszerrel. A kemoterápiás szerek hatásának méréséhez az moDC-kből és makrofágokból származó tenyészet felülúszóit 5 nappal a monociták elválasztása után gyűjtöttük össze, és az IL-10, TGFβ, IFNγ, IL-12, IL-1β és TNFα citokinek, valamint az IP-10 és IL-8 kemokinek koncentrációját mértük.

##### *Sejt migráció vizsgálata*

A Boyden kamrában  $5 \times 10^4$  sejtet adtunk a felső kamrába, és az alsó kamrába helyeztünk 3 ng/ml CCL2 vagy 10 ng/ml CCL5 kemokin jelenlétében vagy hiányában mértük a DC-k és makrofágok migrációját. 4 óras 37 °C-on végzett inkubálás után az alsó kamrából vándorolt sejteket összegyűjtöttük. A migrált sejteket ezután számszerűsítettük a sejtek Novocyt2000R Flow Cytometer segítségével, és az adatokat a FlowJo v X.0.7 szoftverrel elemeztük.

##### *A T-limfocita polarizáció vizsgálata*

A monocita eredetű DC-ket és makrofágokat allogén perifériás vér limfocitáival (PBL) együtt tenyésztettük három, öt vagy kilenc napig RPMI-1640 tápközegben. 1:10 moDC/makrofág:T-sejt arány mellett 37 °C-on. Annak meghatározására, hogy mely T-limfocita populációkat polarizálták az előkondicionált DC-k és makrofágok három, öt vagy kilenc nap elteltével, a T-sejteket 1 μg/ml ionomicinnel és 20 ng/ml phorbol-mirisztát acetáttal (PMA) stimuláltuk 4 órán át BD GolgiStop™ fehérjetranszport inhibitor jelenlétében, amit 12 órával a sejtfestés előtt adtunk a sejtekhez. A sejteket anti-humán CD4-PerCP, CD8-PE-vel és/vagy anti-humán CD25-PE-konjugált antitestekkel jelöltük. Ezt követően fixáltuk és permeabilizáltuk a sejteket, majd anti-humán IFNγ-APC-vel, anti-humán IL-4-PE-vel, anti-humán IL-10-Alexa Fluor 488, anti-humán IL-17 és anti-humán FoxP3-APC antitestek kombinációival jelöltük. A fluoreszcencia intenzitását FACS Calibur citométerrel mértük, az adatokat a FlowJo v X.0.7 szoftverrel elemeztük.

##### *Sejtfelszíni molekulák megjelenésének vizsgálata*

A különböző specificitású ellenanyagokkal történő jelölés során a sejtellethez hozzáadtuk a direkt jelölt ellenanyagot, majd 20 percig, 4 °C-on, sötétben inkubáltuk. Ezt követően FACS pufferrel mostuk a sejteket (5 perc, 1500 rpm, 4 °C). Végül a mintákhoz 300 μl FACS-puffert adtunk és a sejtfelszíni

fehérjeexpressziót 10000 db sejten mértük le. A fluoreszcencia intenzitásokat FACS Calibur (BD Biosciences) áramlási citométerrel mértük, az adatok kiértékelését pedig FlowJo szoftverrel végeztük.

## *Intracelluláris molekulák megjelenésének vizsgálata*

Az intracelluláris jelöléshez  $10^6$  sejtet kezeltünk fixáló/permeabilizáló oldattal (BD Cytifix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit) sötétben, 20 percen keresztül,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Ezt követően FACS pufferben, illetve PermWash pufferben mostuk a sejteket (5 perc, 3000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A következő lépésben az antitesttel való intracelluláris jelölést végeztük el, 20 percen keresztül,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Az aspecifikusan kötött antitestet PermWash, majd FACS pufferrel való mosással távolítottuk el (5 perc, 3000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Végezetül a mintákhoz 300  $\mu\text{l}$  FACS-puffert adtunk és a sejtfelszíni fehérje expressziót áramlási citométerrel, minden mintából 10000 sejtet mértünk le.

## 4.5 In vitro sejt módosítások

### *Az siRNS és expressziós vektorok felépítése:*

Az egér SHP-1 csendesítéséhez pSuper emlős expressziós vektorba (OligoEngine) klónoztuk az SHP1 957-976 nukleotidjainak megfelelő szekvenciát (CAAGAACCGCTACAAGAAC) és annak fordított komplementerjét amelyeket egy kilenc nukleotidból álló nem-komplementer spacer választott el egymástól (ttcaagaga). Ezt a vektort pSuper shRNAi SHP-1-nek neveztük. Az egér Vav1 csendesítéséhez a 1563–1582 nukleotidoknak megfelelő RNSi nukleotidokat (GAAGUGGAUGGAACAGUUC) használtuk.

A20 sejtek ranszfekcióját az pSuper shRNAi SHP-1 vagy a kontroll vektorok transzfektálásával végeztük, 300 V 20 ms-ig 20 mg Amaxa Nucleofection Technologyt (Amaxa, Köln, Németország) és a stabil sejteket geneticinnel szelektáltuk. Átmeneti transzfekcióhoz a sejteket 0,5 ml komplett RPMI tápközegben szuszpendáltuk és 100 nM Vav (GAAGUGGAUGGAACAGUUC) RNSi szekvenciákkal transzfektáltuk 260 V 20 ms-ig. A sejteket friss tápközegben újra szuszpendáltuk, és a transzfekciót 24 órás inkubáció után megismételtük. További 24 óra elteltével a fehérje expressziót Western blottal határoztuk meg, és elvégeztük a sejthalál vizsgálatot.

### *A target sejtek overexpressziója lentivirális rendszerrel*

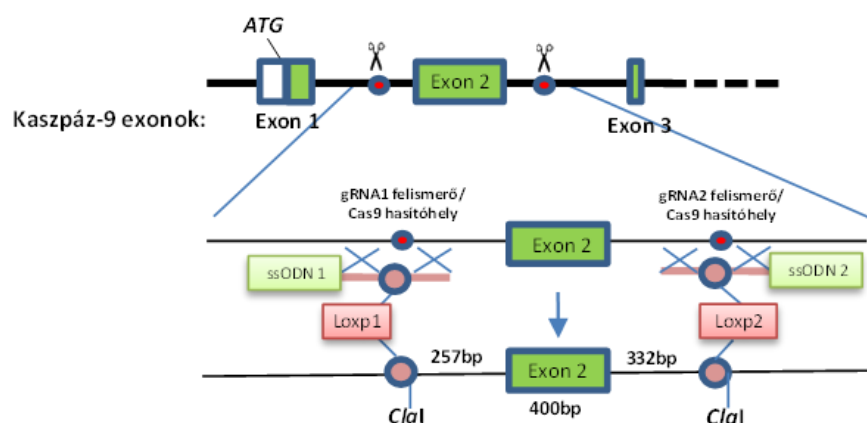
A RIPK1 és RIPK3 indukálható overexpressziójához szükséges konstrukciókhoz az alábbi plazmidokat használtuk fel templátként: pCR3-FLAGhRIP1 (Cabri, #LMBP4850), hRIP3 GFP wt (Addgene, #41387). A RIPK1 és RIPK3 szekvenciáját először a pENTR4-FLAG (Addgene, #17423) Gateway donor (klónozó) vektorba ligáltuk, majd ezt követően átrekombináltuk a pCW57.1 (Addgene, #41393) vektorba, mely egy lentivirális „All-in-one” tetraciklin/ doxiciklin indukálható Gateway célvektor (expressziós vektor, mely lehetővé teszi az indukálható expresszióhoz szükséges reverz tetraciklin transzaktivátor (rtTA) és a célgén egyidejű bevitelét). Minden klónozási lépést restriktációs hasítással és szekvenálással is megerősítettünk. A transzdukcióhoz használt replikációra képtelen lentivírusok létrehozásához az alábbi csomagolóvektorokat használtuk, melyeket kalcium-foszfát transzfekcióval

juttattunk be a vírustermelésre használt HEK 293FT sejtekbe: VSV-G envelopot kódoló pMD2.G (Addgene, #12259) és psPAX2 (Addgene, #12260), mely tartalmazza a Gag, Pol, Rev, and Tat géneket. A kalcium-foszfátos kicsapást 1,35 ml desztillált H<sub>2</sub>O és 150 µL 2,5 m CaCl<sub>2</sub> és 1,5 ml 2× HEPES-pufferolt sóoldat hozzáadásával végeztük. Az oldatot szobahőmérsékleten 30 percig inkubáltuk, majd cseppenként hozzáadtuk a tenyésztett HEK293FT sejtekhez. 16 órával a transzfekció után a tápközeget friss, magas glükóztartalmú DMEM-re cseréltük ki, amelyet 10% FBS-sel, 2 mm-es l-glutaminnal egészítettünk ki. A vírus felülűszóit a transzfekció után 48 és 72 órával összegyűjtöttük, és egy 0,45 µm-es szűrőn engedték át. A célsejteket egy éjszakán át lentivírus felülűszóval inkubáltuk 4 µg·mL<sup>-1</sup> polibrén jelenlétében. A fertőzött sejteket 5 µg·mL<sup>-1</sup> puromicinnel vagy 10 µg·mL<sup>-1</sup> blaszticidinnel választottuk ki 7 napig.

#### 4.6 In vivo vizsgálatok

##### *Kaspáz-9 kondicionális leütése egér hasnyálmirigy acinar sejtekben*

A kaspáz-9 „floxolt” egértörzset Dr. Máté Zoltán, Dr. Erdélyi Ferenc és Dr. Szabó Gábor kollaborációs partnereink hozták létre (Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, Orvosi Géntechnológiai Részleg, Budapest). Ehhez CRISPR/Cas9 módszerrel két darab loxP szekvencia lett beillesztve a kaspáz-9 második exonját határoló intronikus régiókba (**13. ábra**). Az intron régióra specifikus irányító RNS-ek szintetizálása in vitro történt. A loxP szekvenciát hordozó templátok és a homológia alapú rekombinációt (homology directed repair – HDR) lehetővé tevő homológ karok egyszerű oligomerekként (ssODN) lettek szintetizáltak. A két irányító RNS (50-50 ng/ml), a két ssODN (15-15 ng/ml) és a Cas9 mRNS (TriLink Biotechnologies, 60 ng/ml) FVB/Ant egerek (Jackson Laboratory, FVB.129P2-Pde6b+ Tyrc-ch/AntJ, #004828) megtermékenyített pronukleuszába lettek injektálva.



**13. ábra.** | **Kaspáz-9 floxolt egértörzs módosítási stratégiája.** A két darab beillesztett loxP hely, a kaspáz-9 második, mintegy 400 bázispár hosszú exonját határolja. Ez az exon az összes eddig ismert kaspáz-9 transzkript variánsban megtalálható, így eltávolításával minden variáns expressziója megakadályozható. Amennyiben a második exon kivágódik, úgy az azt követő exonok kiesnek a helyes „frame”-ből, vagyis a kereteltolódás miatt egy korai stop kodon alakul ki. Így az eredetileg 454 aminosavból álló fehérjéből egy mindössze 73 aminosavból álló termék marad, ami az első 44 aminosavban (első exon) egyezik meg az eredeti fehérjével.

## koncz.gabor\_172\_24

A sikeres beillesztés PCR-ral lett megerősítve (a szekvenciák beillesztése bázistöbbletet okoz, mely specifikus primerekkel detektálható). Végző ellenőrzésként megszekvenáltuk a loxP helyek által közrefogott régiót, ami megerősítette, hogy a módosítás sikeres volt. Ezt követően az eddig használt FVB/Ant egértörzset (mely már hordozta a loxP helyeket) nyolc generáción át visszakeresztettük C57BL/6J egerekkel. A kaszpáz-9 floxolt egereket hasnyálmirigy acinar sejt specifikus tamoxifen indukálható rendszerű, Cels1 promóter transzkripció szabályozása alatt álló Cre rekombinázt expresszáló egértörzssel (Jackson Laboratory, Tg(Cels1-cre/ERT)1Lgdn/J, #025736) kereszteztük. A későbbi kísérletek során loxP homozigóta és cre heterozigóta állatokat használtuk.

A kísérleti állatokat általános állatházi körülmények között (22-24 °C-os helyiségben, 12 órás világos-sötét ciklust tartva, szabvány ketrecekben, 4-6 egeret ketrecenként) tartottuk a Debreceni Egyetem, Élettudományi Épület Kísérleti Állatházában (Nyilvántartási szám: III/4-KÁT/2015). Minden állat részére konvencionális sterilizált ételhez és autoklávozott vízhez való szabad hozzáférést biztosítottunk. Az állatkísérleteket a National Institutes of Health (NIH) előírásainak megfelelően és a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve szerint hajtottuk végre az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács engedélyével (a kísérletek engedélyszáma: XXI./1542/2020).

### *Akut pankreatitisz modell*

Az akut pankreatitisz tüneteinek súlyosságát a vad típusú és kaszpáz-9 deficiens egerekben Dr. Pallagi Petra, Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink vizsgálták (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. számú Belgyógyászati Klinika és Népegészségtani Intézet, MTA-SZTE Lendület Epitél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport). A Cre rekombinázt expressziója 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifen (5 mg/ml napraforgó olajban oldva) orális adásával (gavage) lett indukálva 5 egymást követő napon keresztül. Ezt követően nyolc órán át, óránként 50 mg/testtömeg-kilogramm cerulein intraperitoneális adásával történt az akut pankreatitisz kiváltása. Az állatokat 12 óra múlva túlaltatással termináltuk, majd ezt követően vér- és szövetszövetmintákat gyűjtöttünk.

A gyűjtött vérmintákból a szérumot centrifugálással izoláltuk (4 °C-on, 2500 RCF-en, 15 percig), majd felhasználásig -20 °C-on tároltuk. A szérum amiláz aktivitást kolorimetriás kittel határoztuk meg. A reakciókat a gyártó utasításának megfelelően hajtottuk végre, az abszorbanciát 405 nm-en detektáltuk FLUOstar OPTIMA Microplate Reader készülékkel. A szövetszövetmintákat 4%-os formaldehid oldattal fixáltuk és felhasználásig 4 °C-on tároltuk. Paraffinba történő ágyazást követően a mintákat 4 µm-es darabokra metszettük kriosztáttal, melyet hematoxin-eozin festés követett. A gyulladáshozos sejtek infiltrációját, a nekrozis és ödéma mértékét három független kutató értékelte (0-5 pontos skálán).

### *Immunfluoreszcens jelölés*

A kaszpáz-9 hasnyálmirigy acinar sejtekben való leütésének sikerességét Dr. Pallagi Petra, Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink mutatták ki (Szegedi Tudományegyetem, Általános

Orvostudományi Kar, I. számú Belgyógyászati Klinika és Népegészségtani Intézet, MTA-SZTE Lendület Eritél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport). 125 mg/testtömeg-kilogramm tamoxifen 5 egymást követő napon keresztül történő adásával indukáltuk a Cre rekombinázt expresszióját, majd az állatokat túlaltatással termináltuk. Ezt követően hasnyálmirigy szövetmintákat izoláltunk, melyeket Shandon Cryomatrix médiumban lefagyasztottunk és kriosztáttal 7 µm-es darabokra metszettünk. 4% paraformaldehid fixálást és blokkolást követően a mintákat 100x-osra hígított kaszpáz-9 specifikus antitesttel jelöltük overnight 4 °C-on. Másodlagos antitestként Alexa Fluor 488 konjugált IgG antitestet használtunk, a sejtmagot Hoechst-33342 festékkel jelöltük. Fluoromount mounting médiummal való fedést követően a képeket Zeiss LSM880 konfokális mikroszkóppal készítettük 40x-es olaj immerziós objektívet használva.

### *Fehérje izolálás hasnyálmirigy szövetmintákból*

A fehérje izolálást cerulein kezelt és a kezeletlen egerek hasnyálmirigyéből Dr. Pallagi Petra, Tél Bálint és Dr. Maléth József kollaborációs partnereink valósították meg (Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, I. számú Belgyógyászati Klinika és Népegészségtani Intézet, MTA-SZTE Lendület Eritél Sejt Szignalizáció és Szekréció Kutatócsoport). Az állatokat a cerulein kezelést követően 12 óra múlva túlaltatással termináltuk, majd ezt követően izoláltuk a hasnyálmirigyét, amit ezt követően szikepengével apró darabokra vágunk. A hasnyálmirigy szövetdarabokat ezt követően 1 ml proteázgátló koktéllal kiegészített RIPA pufferben lizáltuk. Az így kapott mintát jégen tartva szonikálással homogenizáltuk, majd 4 °C-on 3500 rpm-en 10 percig centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót „snap-freeze” módszerrel gyorsfagyasztottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

## 4.7 Statisztikai analízis

Valamennyi ábra legalább három, egymástól független donorból származó eredmények átlagait mutatja  $\pm$ standard szórással (SD). Az eredmények statisztikai elemzése során adott esetben Student-féle t-próbát, vagy kétszemponos varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk Tukey post-hoc teszttel. A statisztikai számítások elvégzéséhez GraphPad Prism programot használtunk (verziószám: 6.01, La Jolla). Azokat a változásokat tekintettük szignifikánsnak, ahol  $p < 0,05$  volt. Az ábrákon látható szignifikanciaszinteket az alábbiak szerint ábrázoltuk: \*P <0,05; \*\*P <0,01; \*\*\*P <0,005, \*\*\*\*P <0,001.



## 5 EREDMÉNYEK

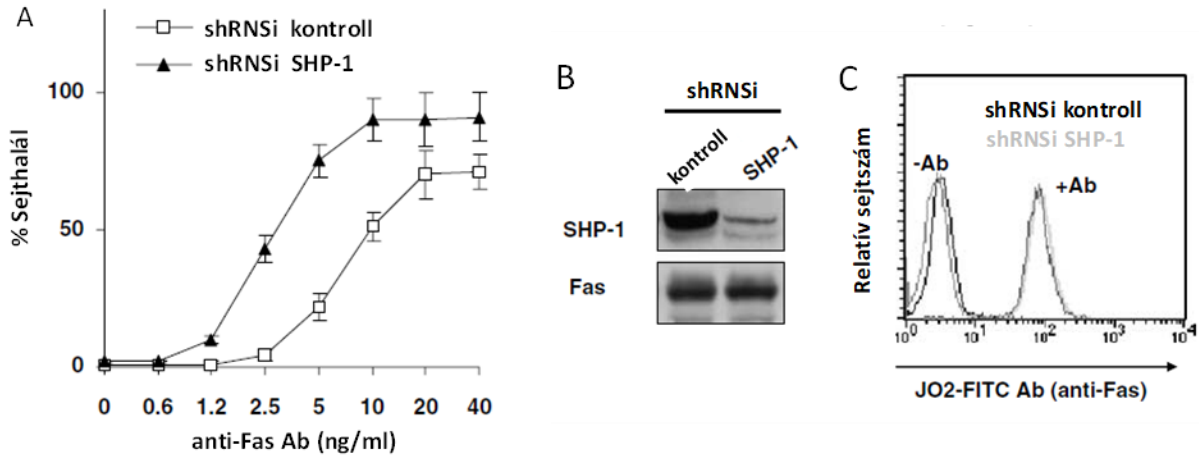
### 5.1 Az SHP-1 a Fas-citoszkeleton kapcsolat szabályozásán keresztül befolyásolja az apoptózist [117].

Az SHP-1 foszfatáz interakciója a Fas receptorral irodalmi adatok alapján már ismert volt [118], azonban funkcióját az sejthalál szignálokban nem tisztázták. Az SHP-1 Fas-indukált apoptózisban játszott szerepének vizsgálatára egy stabil SHP-1 (shRNS) csendesített sejtvonalat hoztunk létre. Az SHP-1 mennyiségének csökkenése az A20 egér B sejtvonalon fokozta az anti-Fas által kiváltott apoptózist a kontroll sejtvonálhoz képest (**14. ábra**). Az UV-indukált, intrinszik apoptotikus útvonalra azonban SHP-1 mennyisége nem volt hatással (nem mutatott adat).

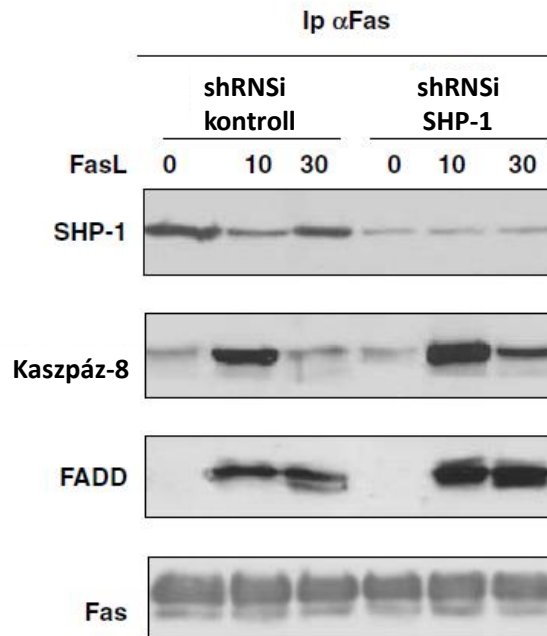
Az SHP-1 kötődése a Fas receptorhoz már a nyugvó, FasL-dal nem kezelt sejtekben is kimutatható volt, azonban aktivációt követően a sejthalál indukáló komplex kialakulásával egyidőben ez az asszociáció megszűnt, majd a DISC szétesésével ismét kialakult a Fas-SHP-1 kapcsolat (**15. ábra**). Mivel eredményeink szerint az SHP-1 jelenléte befolyásolta a Fas-indukált apoptózist, megvizsgáltuk, hogy az extrinszik apoptotikus jelpálya mely lépését szabályozza az SHP-1. Kimutattuk, hogy Fas expressziója azonos volt SHP-1 jelenlétében és hiányában (nem mutatott adat). A DISC összeszerelődését vizsgálva megállapítottuk, hogy SHP-1 hiányában a FADD és a kaszpáz-8 is erősebben kötődik a Fas receptorhoz és a komplex hosszabb ideig is maradt egyben (**15. ábra**). Ezzel összhangban a kaszpáz-8, valamint a jelátviteli útvonalban downstream elhelyezkedő, kaszpáz-9 és PARP hasítása is intenzívebbnek bizonyult SHP-1 csendesített sejtekben (nem mutatott adat).

Az SHP-1 foszfatáz Fas-indukált apoptózisban játszott szerepének tisztázásához összehasonlítottuk FasL-dal aktivált sejtekben a tirozinon foszforilált fehérjék mennyiségét SHP-1 csendesített és vad típusú sejtekben. SHP-1 hiányában több fehérje foszforiláltsága is megnőtt a kezeletlen és a FasL-dal aktivált mintákban egyaránt (**16. ábra**). Kimutattuk, hogy a Vav tirozin foszforilációja FasL aktivációt követően jelentősen lecsökken vad típusú sejtekben, miközben szinte változatlan marad SHP-1 csendesített sejtekben, mutatva, hogy az SHP-1 felelős a Vav defoszforilációjáért Fas receptor aktiválását követően (**16. ábra**). Ezzel szemben a Cbl adaptor fehérje foszforiláltsága SHP-1 függetlennek bizonyult.

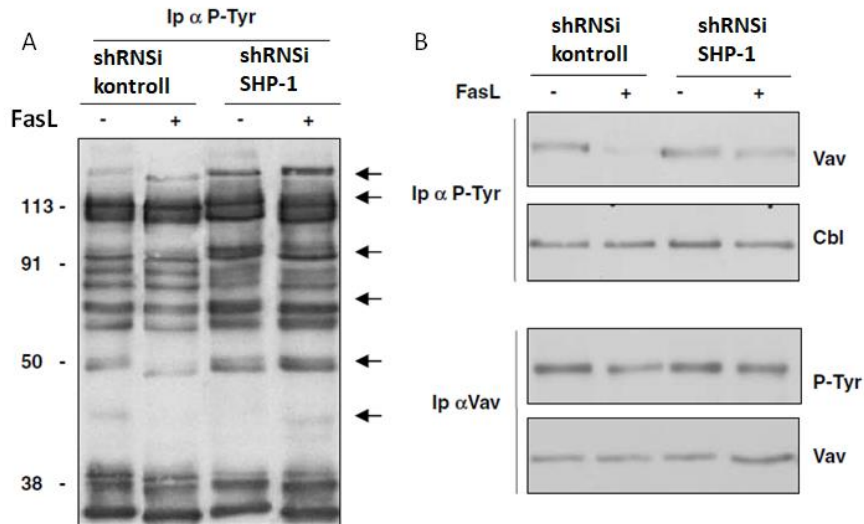
Miután kimutattuk, hogy a Vav foszforilációja SHP-1 függően változik FasL indukciót követően, megvizsgáltuk, hogy a Vav milyen szerepet tölt be a Fas-mediált apoptózisban. A Vav mennyiségét siRNS-sel csendesítettük SHP-1 hiányos és vad típusú A20 sejtekben. A Vav mennyiségének csökkenése fokozta az anti-Fas ellenanyaggal kiváltott apoptózist, de ez a fokozó hatás már nem érvényesült SHP-1 csendesített sejteken, ami azt valószínűsíti, hogy a két molekula azonos jelpályán helyezkedik el. Ennek megfelelően megnövekedett Vav expresszió mellett az SHP-1 apoptózist fokozó hatása nem érvényesült, a Vav overexpressziója kompenzálta az SHP-1 mennyiségének csökkenését, visszaállítva a sejthalált a vad típusú, SHP1-et kifejező sejtek szintjére (**17. ábra**).



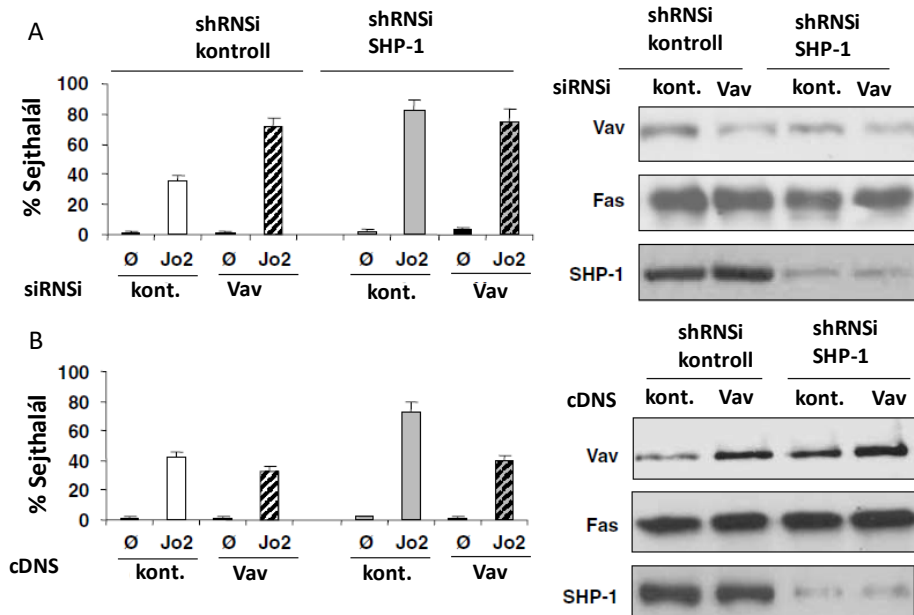
**14. ábra. Az SHP-1 csendesítése fokozta a Fas-indukált sejthalált.** (A) Kontroll (shRNSi) és SHP-1 csendesített sejteket (shRNSi SHP-1) a jelzett dózisokban JO2 anti-Fas ellenanyaggal kezeltük 3 óráig, majd a DNS fragmentáció (subG1 populáció) mérésével áramlási citometriával detektáltuk a sejthalált. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. (B) Az SHP-1 shRNSi által kezelt sejtek teljes sejtlizátumában Western-blottal vizsgáltuk az SHP-1 mennyiségét, loading kontrollnak a Fas receptort használva. Az ábrán egy reprezentatív Western blot látható 5 független kísérletből. (C) FITC-konjugált anti-Fas (JO2) ellenanyag használatával áramlási citometriával detektáltuk a Fas sejtfelszíni expresszióját a kontroll RNSi-val kezelt (sötét görbék) és az SHP-1 csendesített sejtekben (világos szürke görbék). Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható 3 független kísérletből.



**15. ábra. Az SHP-1 eltérő kinetikával asszociálódik a Fas receptorral, mint a FADD és a kaszpáz 8.** Kontroll és SHP-1 csendesített A20 sejteket aktiváltunk 10, illetve 30 percig 200 ng/ml rekombináns FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. A biotinilált anti-Fas ellenanyaggal történő immunprecipitációt követően a toborzott molekulákat Western-blottal mutattuk ki. Az ábrán egy reprezentatív kísérlet eredménye látható 3 független kísérletből.



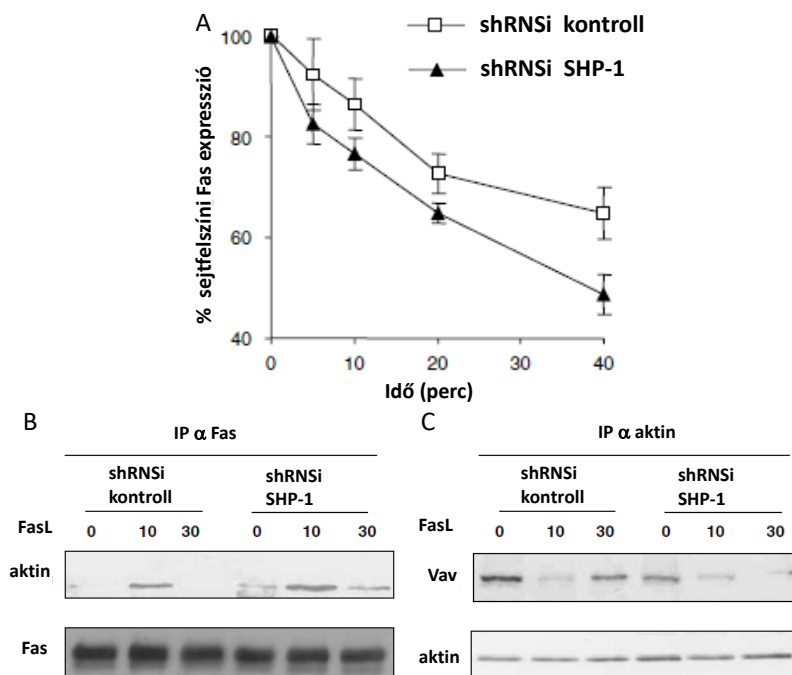
**16. ábra.** Az SHP-1 csendesített sejtekben FasL-stimuláció hatására fokozódik egyes fehérjék tirozin foszforiláltsága. Kontroll és SHP-1 csendesített A20 sejteket aktiváltunk 15 percig 200 ng/ml rekombináns FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. (A) A teljes sejtlyúzátumból anti-foszfotirozin ellenanyag segítségével Western-blottal mutattuk ki a foszforilált fehérjéket. (B) Anti-foszfotirozin, illetve anti-Vav ellenanyaggal történő immunprecipitációt követően a toborzott molekulákat specifikus ellenanyagok használatával Western-blottal mutattuk ki. Az ábrákon egy-egy reprezentatív kísérlet eredménye látható 3 független kísérletből.



**17. ábra.** A Vav csendesítése SHP-1 függően fokozta a Fas-indukált sejthalált. (A) Kontroll és SHP-1 csendesített A20 sejtvonalakban (A) siRNSi-val csökkentettük, illetve (B) transzfekcióval (cDNS) növeltük a Vav mennyiségét. A sejteket 100ng/ml JO2 anti-Fas ellenanyaggal kezeltük 2 óráig, majd a DNS fragmentáció (subG1 populáció) mérésével áramlási citometriával detektáltuk a sejthalált. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A csendesített és overexpresszált sejtekben a Vav, Fas és SHP-1 mennyiségét teljes sejtlyúzátumból Western-blottal határoztuk meg. Az ábrán egy reprezentatív Western blot látható 3 független kísérletből.

Irodalmi adatok alapján a Fas-citoszkeleton kapcsolat szükséges a Fas oligomerizációjához, internalizációjához és így az apoptózis kialakulásához [28], a Vav fehérjéről pedig ismert, hogy szabályozza a citoszkeleton átrendeződést [119]. Ezért megvizsgáltuk az SHP1-Vav reguláció szerepét a Fas citoszkeletonnal való interakciójára, a receptor internalizációjára. Kimutattuk, hogy SHP-1 csendesített sejtekben, a megnövekedett sejthalálnak megfelelően, gyorsabb és intenzívebb volt a Fas receptorok endocitózisa, mint vad típusú sejtekben (18. ábra). Saját eredményeink megerősítették, hogy FasL stimulációt követően a Fas receptor kapcsolódik az aktinhoz. SHP1 hiányában a Fas-aktin kapcsolat intenzívebb volt és hosszabb ideig megmaradt, összhangban az internalizáció intenzitásának növekedésével.

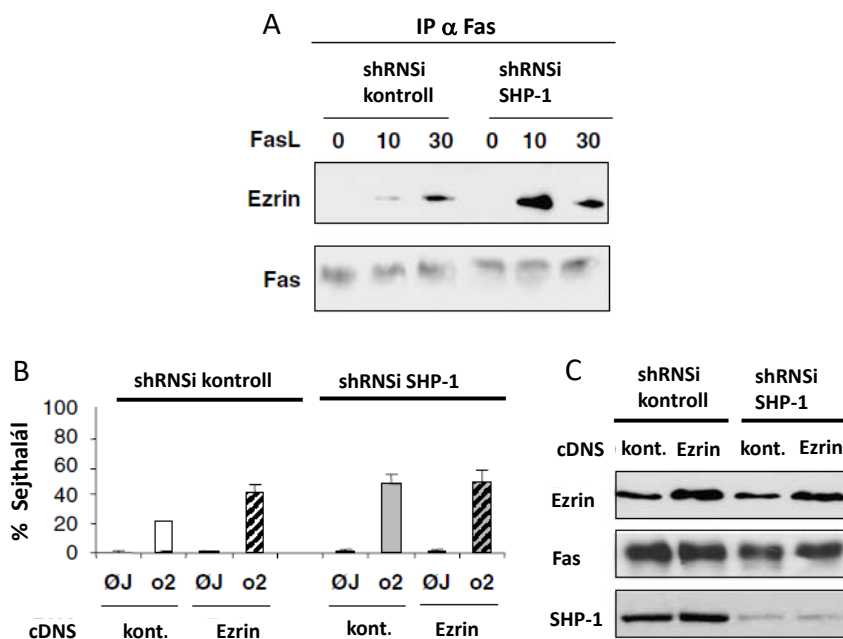
Ezt követően igazoltuk, hogy a Vav-aktin kapcsolat is változik FasL stimulus hatására. A Fas-aktin kapcsolattal ellentétesen, a Vav már nyugvó sejteken is asszociálódott az aktinnal, apoptotikus szignál hatására ez a kapcsolat megszűnt, majd megközelítően 30 perc elteltével újra helyreállt. SHP1 csendesített sejtekben azonban az aktin-Vav asszociáció helyreállása nem volt megfigyelhető (18. ábra).



**18. ábra.** Az SHP-1gátolja a Fas-aktin kapcsolatot és a Fas endocitózisát. (A) Kontroll és SHP-1-csendesített A20 sejtvonalakat aktiváltunk 15 percig 200 ng/ml rekombináns FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. Az ábrán jelzett időpontokban FITC-cel jelzett JO2 anti-Fas ellenanyaggal áramlási citometriával detektáltuk a sejtfelszíni Fas mennyiségét. A mért fluoreszcenca intenzitások (mean) értékét a nem aktivált, csak M2-vel kezelt minták %-ban ábrázoltuk. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. (B-C) Kontroll és SHP-1 csendesített A20 sejteket aktiváltunk 10 vagy 30 percig 200 ng/ml rekombináns FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. (B) Anti-Fas, illetve (C) anti-aktin ellenanyaggal történő immunprecipitációt követően az ábrán bemutatott toborzott molekulákat specifikus ellenanyagok használatával Western-blottal mutattuk ki. Az ábrákon egy-egy reprezentatív kísérlet eredménye látható 3 független kísérletből.

Összességében a Vav-aktin kapcsolat fordított kinetikát mutatott FasL indukciót követően, mint a Fas-aktin asszociáció, és az SHP1 jelenléte mindkét interakciót szabályozta, így az SHP-1-Vav szabályozási út a Fas-citoszkeleton kapcsolat szabályozásán keresztül befolyásolja a Fas-mediált apoptózist.

Irodalmi adatok alapján a Fas-aktin kapcsolat az ezrin fehérje közreműködésével alakul ki [28]. Ezért FasL stimulációt követően összehasonlítottuk vad típusú és SHP-1 csendesített sejtekben a Fas-ezrin interakció kinetikáját. Kimutattuk, hogy FasL indukciót követően az ezrin kapcsolódik a Fas receptorhoz és ez a kötődés intenzívebb volt és hamarabb alakult ki SHP-1 hiányos sejtekben, hasonlóan a Fas-aktin asszociáció változásaihoz (19. ábra). Az ezrin overexpressziója a vártnak megfelelően fokozta az anti-Fas-indukált apoptózist, azonban az SHP-1 hiányában megnövekedett Fas-mediált sejthalált már nem volt képes tovább növelni (19. ábra). Eredményeink ez alapján valószínűsítik, hogy az SHP1 és az ezrin azonos útvonalon keresztül szabályozza a Fas-indukált apoptózist. Összességében modellünk szerint FasL stimulációt követően az SHP1 a Vav defoszforilálásával elősegíti a Vav-aktin kapcsolat kialakulását, ami gátolja a Fas ezrin közvetett kötődését az aktinhoz és így a Fas-aktin asszociáció fennmaradását. Az SHP-1 hatása a Fas-citoszkeleton interakció gátlásán keresztül a sejthalál szignálok terminációjához vezet.



**19. ábra. Az ezrin overexpressziója SHP-1 függően fokozza a Fas-indukált apoptózist.** (A) Kontroll és SHP-1 csendesített A20 sejteket aktiváltunk 10 vagy 30 percig 200 ng/ml rekombináns FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. Anti-Fas ellenanyaggal történő immunprecipitációt követően az ezrin mennyiségét specifikus ellenanyagok használatával Western-blottal mutattuk ki. Az ábrákon egy-egy reprezentatív kísérlet eredménye látható 3 független kísérletből. (B) Transzfekcióval (cDNA) növeltük az ezrin mennyiségét. A sejteket 100ng/ml JO2 anti-Fas ellenanyaggal kezeltük 2 óráig, majd a DNS fragmentáció (subG1 populáció) mérésével áramlási citometriával detektáltuk a sejthalált. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. (C) A csendesített és overexpresszált sejtekben az ezrin, Fas és SHP-1 mennyiségét teljes sejtlizátumból Western-blottal határoztuk meg. Az ábrán egy reprezentatív Western blot látható 3 független kísérletből.

## 5.2 A TLR-9 és a BAFF túlélő jelet közvetít a B sejtek számára a Fas-indukált apoptózissal szemben [120], [121].

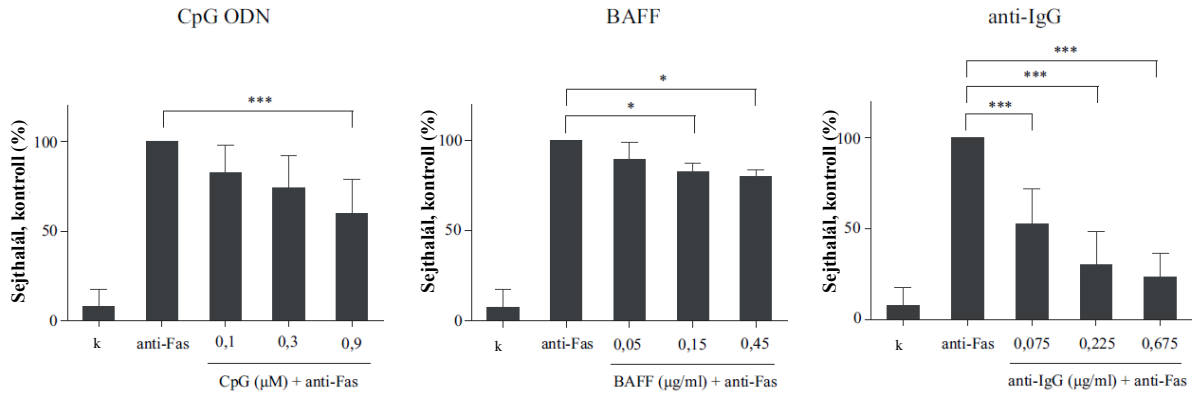
Ismert, hogy a BCR aktivációja túlélő jeleket közvetít a Fas-indukált apoptózissal szemben, biztosítva az antigén specifikus klónok túlélését, segítve a nagy affinitású klónok szelekcióját. Ugyanakkor több nem antigén specifikus (CD19, CD40, IL-4) szignálról is kimutatták, hogy védelmet biztosít a Fas-mediált sejthaláltól [50]. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a BAFF, illetve a TLR9, két az autoimmunitásban szerepet játszó, nem antigén specifikus receptor gátolja-e a Fas-indukált apoptózist. Továbbá, hogy esetleges protektív hatásuk csak BCR-ral együttműködve antigén specifikus módon érvényesül-e, vagy önmagukban is működhet, ami a nem specifikus B sejtek túlélését segítheti elő.

Elsőként olyan B sejtvonalat kerestünk, amelyen a BCR és a Fas mellett a BAFF és a TLR9 receptor is expresszálódik, ez alapján a bemutatott vizsgálatok többségét egér A20 B sejt vonalon végeztük. A három túlélő szignál működését első lépésben külön-külön vizsgáltuk. A receptorok aktivációját specifikus ligandjaikkal (CpG ODN, BAFF, anti-IgG) váltottuk ki, majd egy óra előkezelést követően anti-Fas ellenanyaggal indukáltuk a sejthalált. Kimutattuk, hogy a TLR9, a BAFFR és a BCR egyaránt túlélő jelet közvetít a Fas-mediált apoptózissal szemben (**20. ábra**).

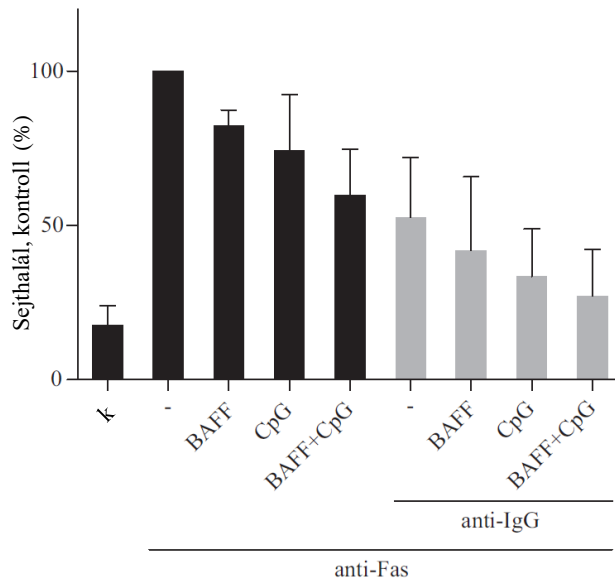
Annak eldöntésére, hogy a TLR-9 és BAFF-mediált protektív hatás fokozza-e BCR-indukált túlélést a három aktiváló ligandum kombinációival kezeltük elő a sejteket a Fas-stimulust megelőzően. A BAFF, illetve a CpG ODN által kiváltott túlélő szignálok additívnak bizonyultak és mindkét ligandum fokozta a suboptimális koncentrációjú anti-IgG által generált túlélő jelet. Ennek megfelelően a három receptor egyidejű aktivációja gátolta legintenzívebben a Fas-közvetített sejthalált. Eredményeink alapján a BAFFR és TLR9 az antigén specifikus és nem-specifikus B sejtek túlélését is fokozza (**21. ábra**).

Mivel a túlélő szignálok hatása additívnak bizonyult, valószínűsítettük, hogy az egyes receptorok esetében eltérő jelpályák aktivációja vezet a Fas-indukált sejthalál gátlásához. A BCR és TLR9 receptorok működését vizsgálva specifikus inhibitorokkal gátoltuk a PI3K (LY 294002), PKC (VCC092935:03), p38MAPK (SB202190), TAK1 (5Z-7-oxozaeanol) vagy Bcr-Abl (Gleevec) kinázokat. Míg a CpG-mediált túlélés PKC, p38MAPK és Bcr-Abl függőnek bizonyult, addig az anti IgG-indukált túlélés PI3K és PKC szignáloknak volt köszönhető (**22. ábra**).

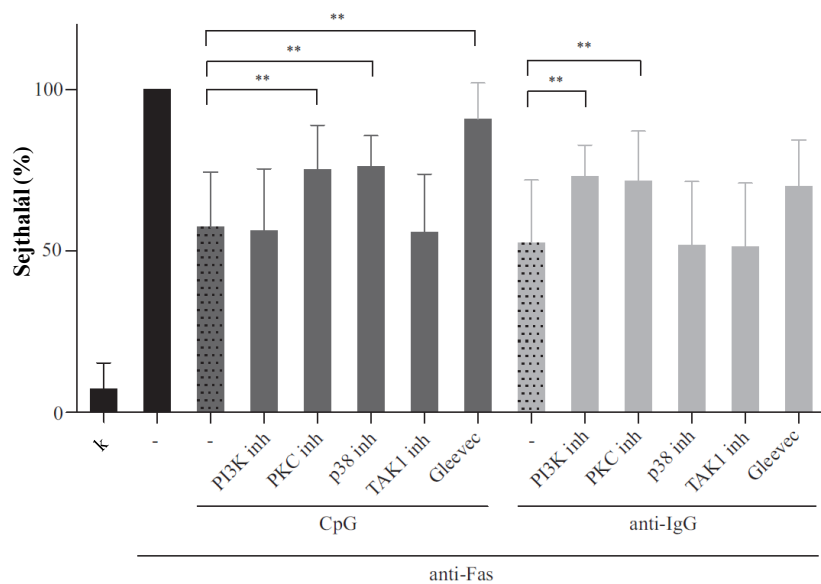
Annak bizonyítására, hogy TLR9 valóban p38MAPK, míg a BCR-PI3K függő módon gátolja a Fas függő apoptózist, az inhibitorokkal kezelt sejtekben mértük a kaszpáz aktivitást anti-Fas indukciót követően túlélő szignálok hiányában, illetve jelenlétében. Megerősítettük, hogy p38MAPK aktivációjának gátlása csak a TLR-9-mediált, míg a PI3K gátlása csak a BCR-indukált túlélést függesztette fel (**23. ábra**). Eredményeink alapján a TLR9 és a BCR részben átfedő részben egyedi (TLR9-p38MAPK, BCR-PI3K) jelpályák aktivációján keresztül biztosít protektivitást a Fas-indukált apoptózissal szemben.



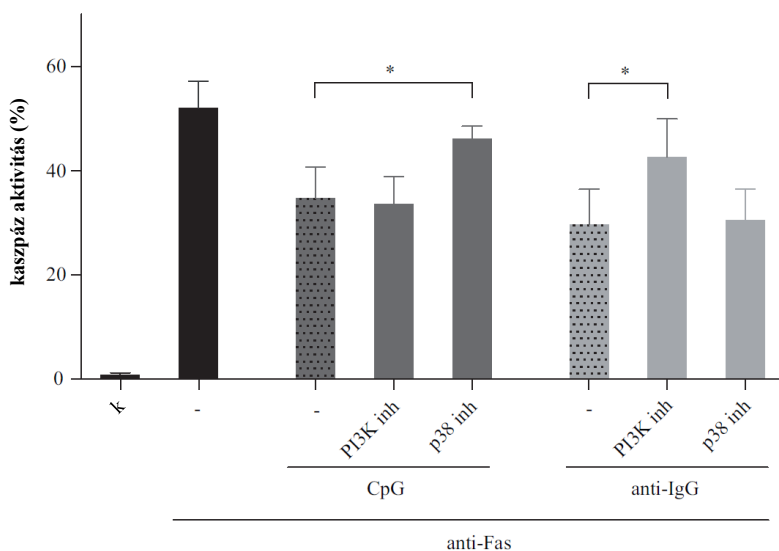
**20. ábra. TLR9, BAFFR és BCR indukált szignálok, dóziszfüggően fokozzák A20 egér B sejtek túlélését a Fas-indukált apoptózissal szemben.** Az A20 sejteket 1 órát előkezeltük CpG ODN, BAFF, vagy anti-IgG az ábrán feltüntetett dózisaival. Ezt követően a sejteket 100 ng/ml anti-Fas ellenanyaggal kezeltük 2,5 óráig. A sejthalált a subG1 sejt populációval jellemeztük PI festést követően. A csak anti-Fas kezelést kapott minták sejthalál értékét 100%-nak tekintve normalizáltuk az adatokat. A bemutatott eredmények 4-9 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják, a statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztük. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



**21. ábra. A CpG, BAFF és anti-BCR stimulusok együttműködése fokozza A20 B sejtek túlélését a Fas-indukált apoptózissal szemben.** Az A20 sejteket 1 órát előkezeltük 0,3  $\mu$ M CpG ODN, 0,15  $\mu$ g/ml BAFF, vagy 0,074  $\mu$ g/ml anti-IgG-vel. Ezt követően a sejteket 100 ng/ml anti-Fas ellenanyaggal kezeltük 2,5 óráig. A sejthalált a subG1 sejt populációval jellemeztük, PI festést követően. A csak Fas kezelést kapott minták sejthalál értékét 100%-nak tekintve normalizáltuk az adatokat. A bemutatott eredmények 4 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják.



**22. ábra. A CpG és az anti-BCR stimulusk részben eltérő jelpályák aktiválásával fokozzák A20 B sejtek túlélését a Fas-indukált apoptózissal szemben.** Az A20 sejteket 30 percig előkezeltük 10  $\mu$ M PI3K, 1  $\mu$ M PKC, 20  $\mu$ M p38 MAPK, 10  $\mu$ M TAK1, vagy 1  $\mu$ M Bcr-Abl inhibitorokkal. Ezt követően a sejteket 0,3 $\mu$ M CpG ODN vagy 0,074 $\mu$ g/ml anti-IgG-vel aktiváltuk 1 órán keresztül. Végül a sejteket 100 ng/ml anti-Fas ellenanyaggal kezeltük 2,5 óráig. A sejthalált a subG1 sejtpopulációval jellemeztük PI festést követően. A csak Fas kezelést kapott minták sejthalál értékét 100%-nak tekintve normalizáltuk az adatokat. A bemutatott eredmények 4 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják, a statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztük. \*\*P < 0.01



**23. ábra. A CpG p38MAPK, az anti-BCR stimulus pedig PI3K jelpálya gátlásán keresztül szabályozza a Fas-indukált kaspáz aktivációt.** Az A20 sejteket 30 percig előkezeltük 10  $\mu$ M PI3K vagy 20  $\mu$ M p38 MAPK- inhibitorokkal, majd 1 órán keresztül aktiváltuk 0,3 $\mu$ M CpG ODN vagy 0,074 $\mu$ g/ml anti-IgG-vel. Ezt követően 100 ng/ml anti-Fas ellenanyaggal apoptózist indukáltunk 2 óráig. Végül a sejteket sejt permeábilis pán-kaspáz peptid-szubsztráttal (D2-R110) töltöttük fel. A kaspáz aktivitást a hasított, fluoreszcens R110 szubsztrátot tartalmazó sejtek százalékában határoztuk meg. A bemutatott eredmények 4-6 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják, a statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztük. \*P < 0.05

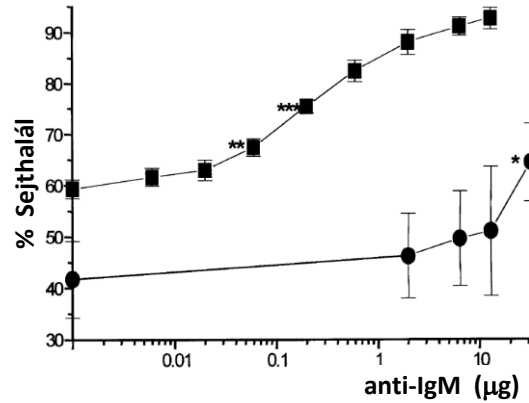


### 5.3 A BCR-mediált szignálok eltérései érett és értelen B sejteken [122]

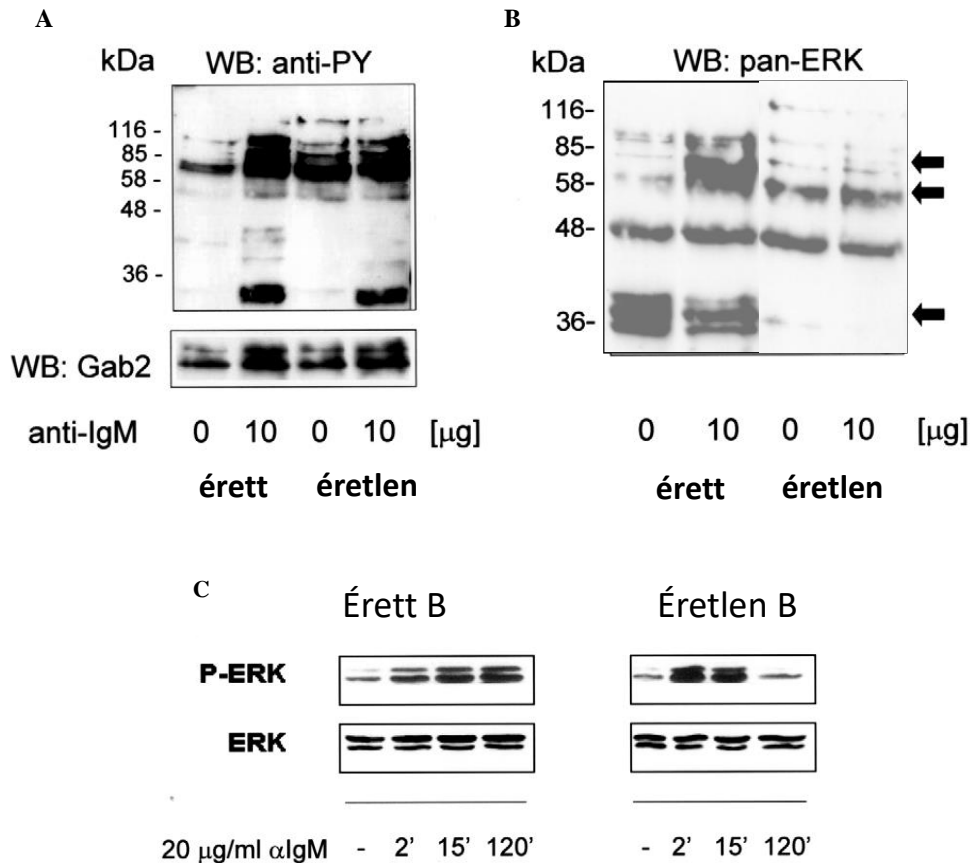
A BCR szignalizáció még nem tisztázott aspektusa, hogy míg a csontvelői fejlődés során a BCR aktiválódása apoptózist indukál, az autoreaktiv klónokat eliminálva, addig az érett B sejteken a BCR stimulus aktivációt, proliferációt okoz. Nem ismert pontosan, hogy milyen jelátviteli különbségek okozzák az érletlen és érett B sejtek BCR működésében a különbségeket. A kérdés vizsgálatához besugarazott egerek lépsejtjeit hasonlítottuk össze normál állatokból nyert B sejtekkel, mivel besugarazást követően két héttel az egerek lépét az érletlen B sejt tulajdonságokkal rendelkező tranzicionális B sejtek repopulálják. Sejt felszíni receptorok vizsgálatával bizonyítottuk, hogy ez a populáció valóban érletlen B sejtnek tekinthető, a CD19 expresszió mellett alacsony IgD, magas IgM expresszió jellemzi ezeket a sejteket, valamint a HSA (heat stabile antigen, CD24) antigén hiánya (nem mutatott adat) [123]. Saját eredményeink megerősítették, hogy az érletlen B sejtekben a BCR aktivációt kiváltó anti-IgM szignál sejthalálhoz vezet, míg érett B sejtekben az anti-IgM indukció csak extrém magas koncentrációban alkalmazva okozott apoptózist. **(24. ábra)**.

A jelátviteli különbségeket vizsgálva megállapítottuk, hogy a két sejt típus BCR-mediált kalcium szignalizációja hasonló, azonban érletlen B sejteken már kisebb anti-IgM dózis is maximális tirozin foszforilációt okozott (nem mutatott adat). A Grb2 associated binder proteins (Gab1/2) adapterhez kapcsolódó molekulák foszforilációjában különbséget detektáltunk a két sejt típus között. Az érletlen B sejtekben ezeknek a fehérjéknek a foszforilációja nem/kevésbé fokozódott BCR szignál hatására, mint az érett sejtekben (25. ábra). Jelentős különbséget tudunk kimutatni a Gab1/2-hoz asszociálódó ERK kinázok mennyiségében is. Míg az érett B sejtekben BCR aktiváció hatására jelentős mennyiségű ERK kötődött a Gab1/2 fehérjékhez, érletlen B sejtekben nem indukálódott az Erk asszociáció **(25. ábra)**. Az Erk1/2 foszforilációját vizsgálva megállapítottuk, hogy BCR aktiváció hatására mindkét sejt típusban pár percen belül megnövekszik az Erk1/2 foszforilációja. Azonban míg az érett B sejtekben ez a foszforiláció 120 perc után is intenzív marad, érletlen B sejtekben transziens foszforilációt követően hamar lecseng.

Eredményeink szerint az érett és érletlen B sejtek BCR indukált jelátvitelében jelentős eltérések mutathatóak ki a Gab1/2-Erk útvonalban. Ezzel összhangban kimutattuk, hogy A20 sejt vonalon (egér érett B sejt vonal) a Gab2 szükséges a PI3K mediált túlélő szignálok létrejöttéhez. Ehhez a funkcióhoz nélkülözhetetlen a Gab2 a PH-doménje, amelyen keresztül az adapter fehérje a sejtmembránhoz kapcsolódik, ezáltal az általa egybegyűjtött molekula komplex lokalizációját szabályozva (nem mutatott adat) [124]. A Gab1/2 adaptor fehérjék szerepének pontos tisztázása a sejthalál, illetve a túlélő szignálok kialakításában, átkapcsolásában további vizsgálatokat igényel.



**24. ábra.** Az éretlen B sejtek érzékenyebbek a BCR indukált sejthalálra, mint az érett B sejtek. Egér lépből érett (■), illetve besugárzást követően 14 nappal éretlen B sejteket (●) izoláltunk. A sejteket különböző dózisú anti-IgM (Fab')<sub>2</sub>-vel kezeltük 24 órán keresztül. A sejthalált a membrán integritás (PI) mérésével határoztuk meg. Az ábrán bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát ±SD mutatják, a statisztikai analízist kétmintás t-próbával végeztük. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001



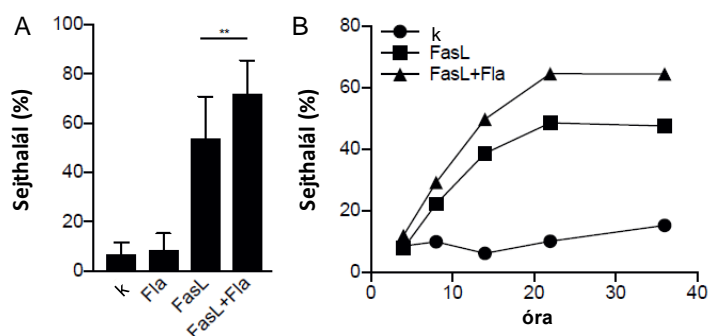
**25. ábra.** Tirozin foszforilált fehérjék és ERK kinázok kötődése éretlen és érett B-sejtekből izolált Gab1/2 fehérjéhez. Egér lépből érett, illetve besugárzást követően 14 nappal éretlen B sejteket izoláltunk. (A-B) A sejteket 10µg/ml anti-IgM (Fab')<sub>2</sub>-vel kezeltük 5 percig. Anti-Gab1/2 antitestekkel végzett immunprecipitációt követően a tirozinon foszforilált fehérjéket, illetve az asszociálódott ERK molekulákat Western blottal detektáltuk. (C) A sejteket 20µg/ml anti-IgM (Fab')<sub>2</sub>-vel kezeltük. Teljes sejtlizátumból detektáltuk a foszforilált ERK1/2 fehérjéket. Az ábrák három független kísérletből egy-egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatják be.

#### 5.4 A flagellin fokozza a Fas-indukált sejthalált[125]

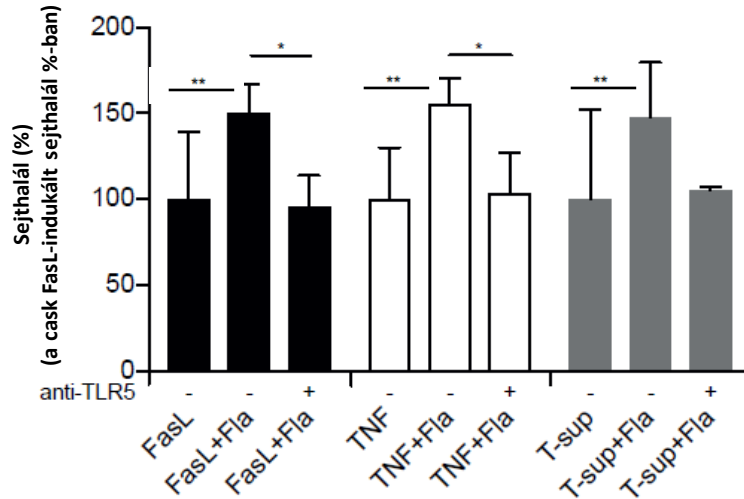
Az immunrendszer által indukált sejthalál folyamatok elsősorban a fertőzött sejtek elpusztításán keresztül a korokozó eliminálásra, életterének szűkítésére irányulnak. A fertőzött sejtek előléseért főként két receptorcsalád, a sejthalál és a mintázat felismerő receptorok által mediált szignálok a felelősek. A két receptorcsalád együttműködését eddig keveset tanulmányozták. FasL használatával Jurkat sejteken apoptózist indukáltunk és vizsgáltuk, hogy az egyes TLR-ok ligandumai módosítják-e Fas mediált sejthalál intenzitását. A TLR5 ligandja a flagellin szignifikánsan fokozta a Fas-indukált sejthalált (26. ábra), míg a többi TLR ligandum hatástalannak bizonyult (nem mutatott adat). A FasL mellett vizsgáltuk a flagellin hatását a TNF indukált sejthalálra, illetve az aktivált T sejtek citotoxikus potenciáljára is. A rekombináns flagellin mindkét esetben növelte a sejthalál intenzitását, hasonlóan a FasL stimulushoz (27. ábra).

Meg kívántuk határozni, hogy mely receptora felelős az apoptózist fokozó hatásért. Neutralizáló anti-TLR5 ellenanyag jelenlétében alkalmazva a rekombináns flagellin nem növelte a sejthalál intenzitását sem FasL, sem TNF, sem aktivált T sejt felülűszóval indukált sejthalál esetében, bizonyítva, hogy a TLR5-felelős a sejthalál folyamatok flagellin mediált szabályozásáért(27. ábra).

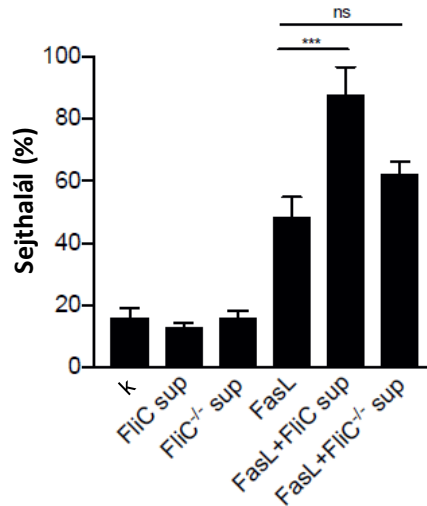
Annak ellenőrzésére, hogy a bakteriális felülűszóban jelen levő flagellin is képes-e a megfigyelt sejthalál fokozó hatást kiváltani dializált *Salmonella enteritidis* baktériumtenyészetek felülűszójával kezeltük elő a Jurkat sejteket, majd FasL-dal sejthalált indukáltunk. A bakteriális felülűszó a rekombináns flagellinhez hasonlóan fokozta a sejthalált. Flagellin deficiens *S enteritidis* baktériumokat használva, azok felülűszója nem növelte a sejthalál intenzitást, mutatva, hogy a 3 kDa-nál nagyobb bakteriális komponensek közül kizárólag a flagellinek van ilyen hatása (28. ábra).



**26. ábra. A flagellin előkezelés fokozza a Fas-indukált sejthalált.** SVT35 Jurkat sejteket előkezeltük 100ng/ml rekombináns flagellinnel egy óráig, majd aktiváltuk 20ng/ml rekombináns FLAG-taggal jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. (A) 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 4 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke;  $**P < 0,01$ . (B) Az ábrán feltüntetett időpontokban meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények egy reprezentatív mérés eredményeit mutatják 3 független mérésből.

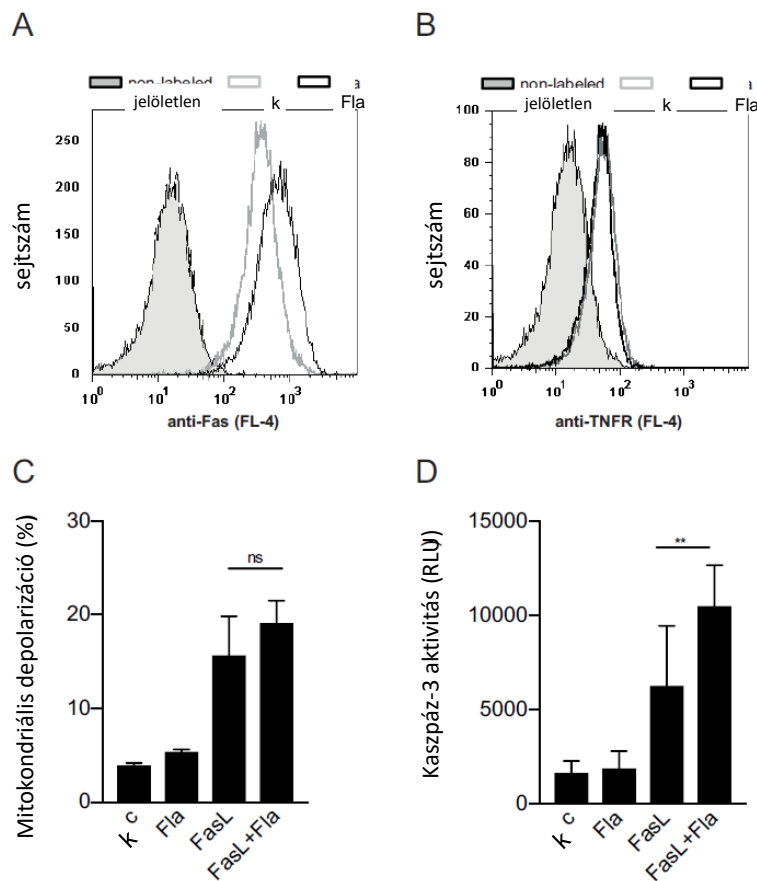


**27. ábra.** A flagellin TLR5 receptoron keresztül fokozza a sejthalál receptorok által indukált apoptózist. SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk 100ng/ml rekombináns flagellinnel egy óráig neutralizáló TLR-5 ellenanyag jelenlétében, illetve hiányában. Ezt követően a sejteket 20ng/ml rekombináns FLAG-taggal jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk, 10ng/ml TNF-fel, vagy PHA-val aktivál T sejtek felülűszójával aktiváltuk. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 5 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .



**28. ábra.** Csak a flagellint expresszáló baktériumok felülűszója képesek növelni a Fas által kiváltott sejthalál mértékét. Salmonella enteritidis baktériumtenyészetek felülűszóját dializáltuk, majd a kis molekulatömegű (<3 kDa) frakciót ultraszűrővel eltávolítottuk. A Jurkat T-sejteket vad típusú (FliC), vagy flagellin hiányos baktériumok (FliC-/-) szűrt felülűszójával kezeltük 1 óráig. Az előkezelt Jurkat sejtekben rekombináns FLAG-taggal jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk váltottunk ki sejthalált. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 5 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\* $P < 0,01$ .

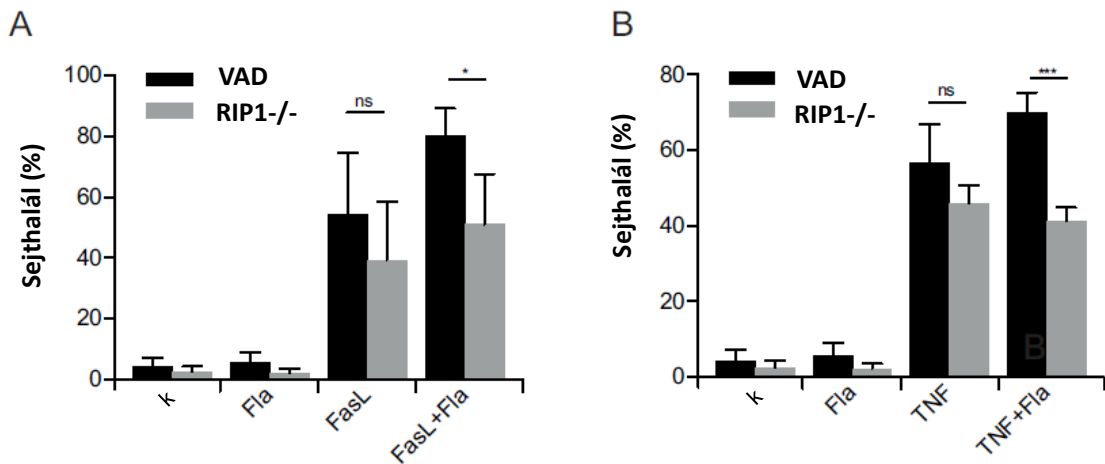
Ahhoz, hogy megállapítsuk, hogy a flagellin apoptózist fokozó hatása a jelátvitel mely lépésében érvényesül, megvizsgáltuk a sejthalál receptorok expresszióját, a mitokondrium depolarizációt és az effektor kaszpázok aktivációját flagellin hiányában, illetve jelenlétében. A rekombináns flagellin 24 órás kezelést követően sem növelte TNFR expressziót és csak minimális mértékben fokozta a Fas expressziót Jurkat sejteken. Kismértékű, de nem szignifikáns emelkedést detektáltunk a mitokondrium membrán polarizáció mértékében, amennyiben a Fas stimuláció flagellin jelenlétében történt. Ezzel szemben a kaszpáz-3 aktivitása szignifikáns mértékben emelkedett FasL-flagellin ko-aktivációt követően. Kimutattuk, hogy rekombináns flagellin hozzáadása nem fokozta a mitokondriális, stressz indukált apoptózist UV stimulus, vagy paclitaxel kezelést követően sem (nem mutatott adat). Így megállapíthatjuk, hogy a flagellin hatása az extrinszik apoptózisra korlátozódik, és a Fas-indukált jelpályákat nem az apoptózis mitokondriális lépésein keresztül szabályozza (29. ábra).



**29. ábra. A flagellin előkezelés sejthalál receptor-indukált apoptózist követően fokozza a kaszpáz-3 aktivációt.** SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk 100ng/ml rekombináns flagellinnel 24 óráig, majd (A) Fas és (B) TNF receptor sejtfelszíni expresszióját detektáltuk fluoreszcensen jelölt anti-Fas vagy anti-TNFR antitesttel. Az ábrázolt eredmények egy reprezentatív mérés eredményeit mutatják 3 független mérésből. (C-D) SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk 100ng/ml rekombináns flagellinnel egy óráig, majd 20ng/ml rekombináns FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk. (C) 4 óra múlva mértük a mitokondrium membrán depolarizációt DIOC6 festékkel. (D) 24 óra múlva lumineszcencia változás alapján detektáltuk a kaszpáz-3 aktivitást. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; **\*\*P < 0,01.**

A sejthalál receptoron keresztül kiváltott apoptotikus szignálok RIPK1 függő és független módon is sejthalált okozhatnak. Megvizsgáltuk, hogy a flagellin fokozó hatása érvényesül-e RIPK1 hiányában. RIPK1 deficiens Jurkat sejtek használatával megállapítottuk, hogy a rekombináns flagellin sem a Fas, sem a TNF, sem a T sejt felülűszó-indukált sejthalál intenzitását nem növelte RIPK1 hiányos sejteken (**30. ábra, illetve nem mutatott adat**).

A RIPK1 függő sejthalál apoptózis mellett nekroptózishoz is vezethet, elsősorban amennyiben a kaszpáz aktivitás gátolt. Kimutattuk, hogy a kaszpáz komprimált körülmények között flagellin fokozni képes a Fas-indukált nekroptózist is, a sejthalál folyamat nekroptotikus voltát specifikus RIPK1 inhibitor, necrostatin-1 használatával bizonyítottuk (nem mutatott adat).



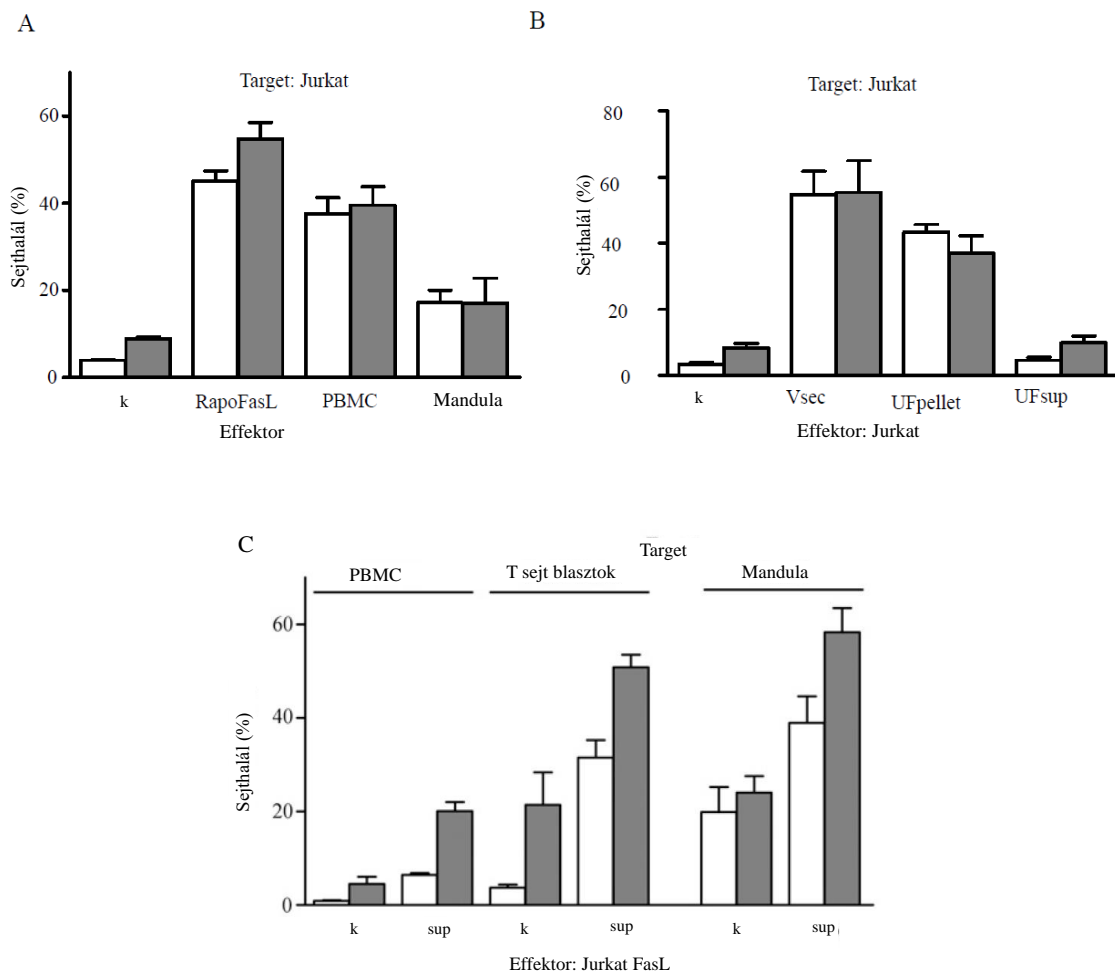
**30. ábra. A Flagellin előkezelés RIPK1 függő módon fokozza a Fas, illetve TNF indukált sejthalált.** SVT35 Jurkat sejteket (WT) és RIPK1 deficiens változatát (RIP1<sup>-/-</sup>) kezeltünk 100ng/ml rekombináns flagellinnel egy óráig, Ezt követően a sejteket (A) rekombináns 20ng/ml FLAG-taggel jelölt FasL-dal, amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk, vagy (B) 10ng/ml TNF-fel aktiváltuk. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 5 független mérés átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

### 5.5 A citotoxikus T sejtek Fas-függő apoptotikus és nem-apoptotikus sejthalált is indukálnak [126]

A citotoxikus T sejtek ölő funkcióit a perforin granzim tartalmú vezikulák szekréciójának, illetve a FasL expresszióinak tulajdonítják [77]. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, milyen szerepet játszik a FasL-mediált folyamat a T sejt felülűszó által kiváltott sejtölésben. A citotoxikus T sejtek ölő funkcióinak vizsgálatához SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo sejt vonal (RapoFasL), PBMC és tonzillából frissen izolált limfociták felülűszójával. PHA aktivációt követően mindhárom sejt típus felülűszója sejthalált indukált a targetként használt Jurkat sejteken, bár a tonzillából származó sejt populáció felülűszója csak kis mértékben volt citotoxikus (**31. ábra**). Következő lépésben a PHA aktivált RapoFasL sejt felülűszójából ultracentrifugálással eltávolítottuk az extracelluláris

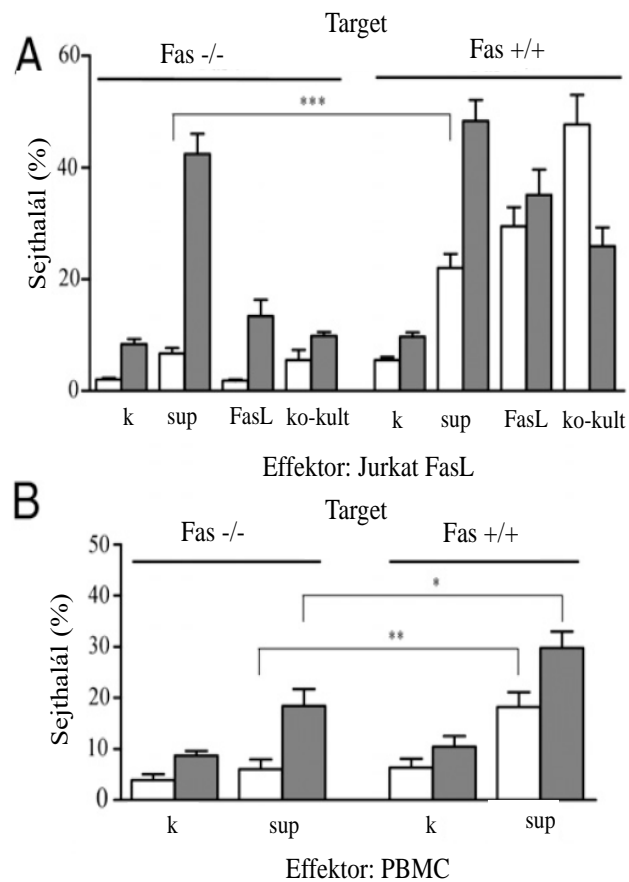
vezikulákat, ami megszüntette a felülűsző sejthalál indukáló képességét, míg az így nyert vezikuláris frakció erősen toxikusnak bizonyult (**31. ábra**). Miután kimutattuk, hogy az aktivált citotoxikus T sejtek elsősorban szekretált vezikulumok által közvetítenek sejthalált, kísérleteink további részében a teljes felülűsző hatását vizsgáltuk.

Annak megállapítására, hogy felülűsző toxikus hatása primer sejteken is érvényesül-e frissen izolált PBMC, illetve előaktivált és 6 napig IL-2 jelenlétében tenyésztett PBMC sejteket (T sejt blasztok) és tonzillából izolált limfocitákat kezeltünk aktivált RapoFasL sejtek felülűszőjével. Az aktivált limfociták (T sejt blasztok és tonzillából izolált sejtek) szenzitívnek, míg a nyugvó limfociták rezisztensnek bizonyultak a T sejt felülűsző indukált sejthalállal szemben (**31. ábra**).



**31. ábra.** Az aktivált T sejtek által szekretált vezikulumok citotoxikus hatásúak. (A) FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejtvonalat (RapoFasL), PBMC-t, vagy tonzillából frissen izolált limfocitákat 100 µg/ml PHA-val aktiváltunk 5 percig. A sejteket friss médiumban inkubáltuk, ezt követően 2 óra múlva a felülűszőt összegyűjtöttük. Az SVT35 Jurkat sejteket 24 órán át kezeltük a különböző sejtek felülűszőjével. (B) A PHA-val aktivált RapoFasL sejtek felülűszőjét ultracentrifugáltuk, majd a pellettel és a felülűszővel 24 óráig kezeltünk SVT35 jurkat sejteket. (C) Frissen izolált vagy, 6 napig előaktivált PBMC sejteket, vagy frissen izolált mandulasejteket 24 órán keresztül kezeltünk PHA-val aktivált RapoFasL sejtek felülűszőjével. A sejthalált a subG1 csúcs (üres oszlopok) és a membrán integritás (PI) (szürke oszlopok) mérésével határoztuk meg. Az adatok legalább öt független kísérlet átlagát ±SD mutatják.

Azt, hogy a T sejt felülűszó citotoxikus funkciójában a Fas-FasL indukált sejthalál milyen szerepet játszik, Fas negatív Jurkat Rapo és vad típusú sejt vonal összehasonlításával végeztük. Míg a rekombináns FasL, illetve a FasL overexpresszáló WSU B sejt vonal csak a Fas expresszáló sejt vonalon indukált sejthalált, a FasL expresszáló Jurkat sejtek, illetve az aktivált PBMC sejtek felülűszója a Fas deficiens sejteken is sejthalált okozott. Azonban Fas expresszió hiányában apoptotikus, subG1 pozitív sejthalál, illetve kaszpáz aktiváció (nem mutatott adat) nem volt detektálható felülűszó kezelés hatására, míg a sejtmembrán integritás elvesztése mindkét sejt vonalnál kimutatható volt (32. ábra). Összeségében, a T sejtek felülűszója Fas-függő apoptózist és ennek hiányában Fas-független nekrotikus sejthalált is indukál. A Fas-független nekrozis TNF és TRAIL gátlók jelenlétében sem szűnt meg, mutatva, hogy sejthalál receptor független folyamat aktiválódik (nem mutatott adat).

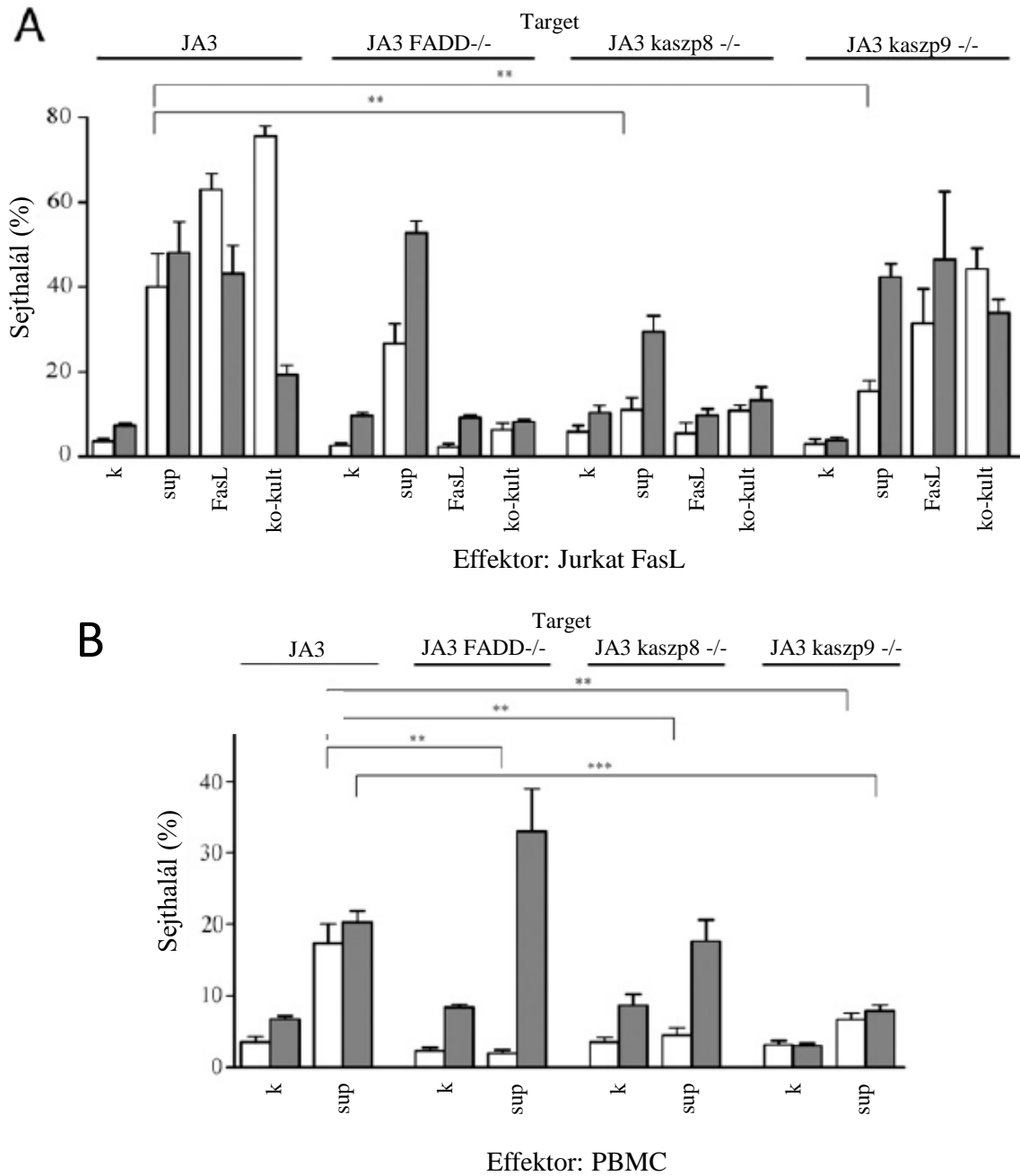


**32. ábra. T sejt felülűszó Fas függő apoptózist, de Fas független nekrotikus sejthalált indukál.** FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejt vonalat (Jurkat FasL), illetve frissen izolált PBMC-t 100 µg/ml PHA-val aktiváltunk 5 percig. A sejteket friss médiumban inkubáltuk, ezt követően 2 óra múlva a felülűszót összegyűjtöttük. Fas-negatív Jurkat Rapo sejt vonalat és ennek Fas-t expresszáló megfelelőjét, mint célsejteket kezeltük a PHA-aktivált sejtek felülűszójával, vagy M2 antitesttel keresztköttött (20 nM) rekombináns FasL-dal, illetve ezeket a sejteket FasL-ot expresszáló WSU B sejt vonallal helyeztük ko-kultúrába. A sejthalált a subG1 csúcs (üres oszlopok) és a membrán integritás (PI) (szürke oszlopok) mérésével határoztuk meg. Az adatok legalább öt független kísérlet átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez kétmintás T próbát használtuk. A szignifikancia értéke; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01.

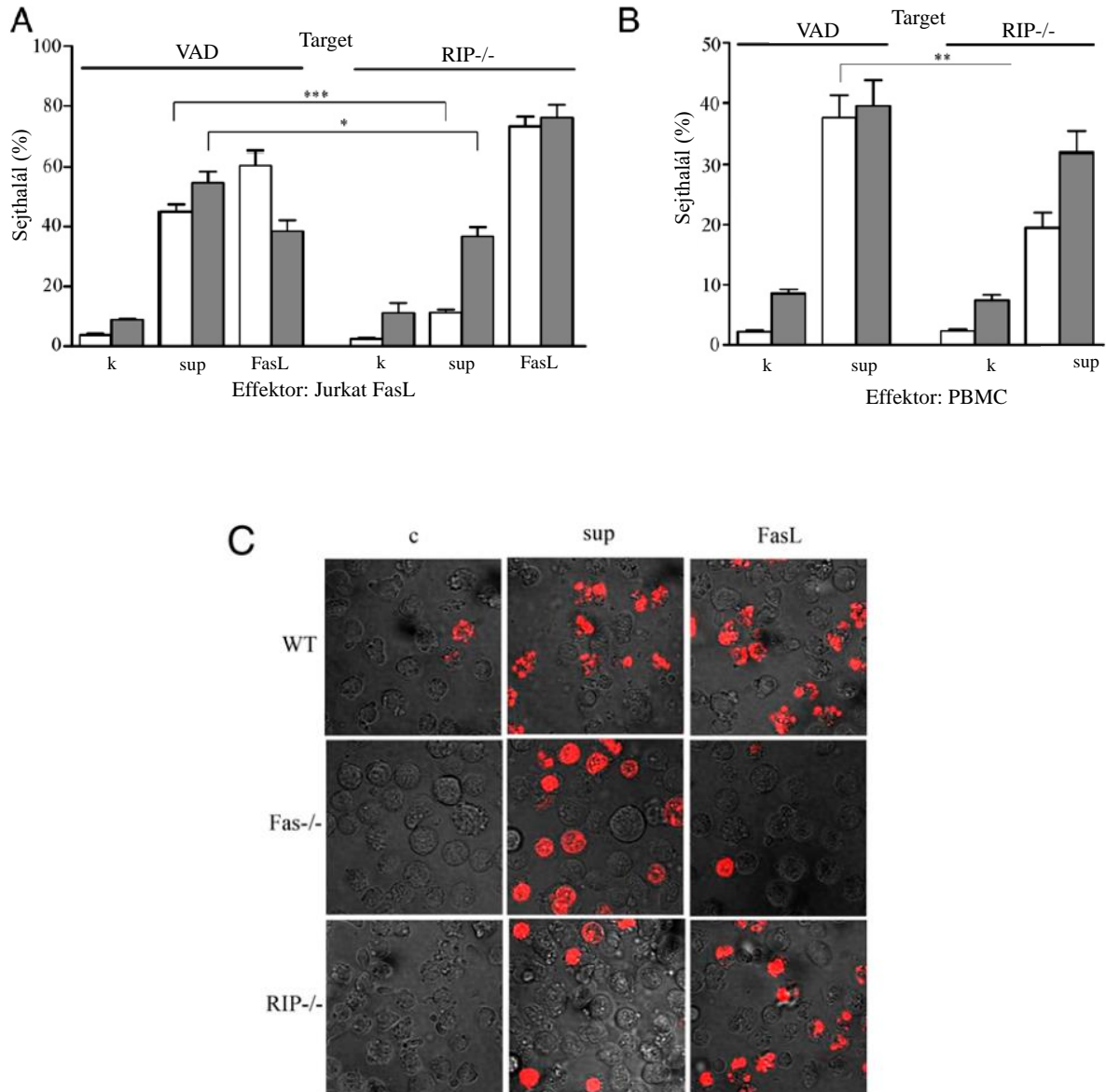


A felülúszó mediált sejthalál további vizsgálatához az apoptózis jelátvitelében résztvevő legfontosabb molekulák szerepét kívántuk tisztázni. FADD, kaszpáz-8, vagy kaszpáz-9 negatív Jurkat sejtek és vad típusú megfelelőik sejthalál érzékenységét hasonlítottuk össze klasszikus FasL stimulus, illetve aktivált FasL overexpresszált Jurkat vagy PBMC sejtek felülúszójának jelenlétében. Az irodalmi adatoknak megfelelően FADD, vagy kaszpáz-8 hiányában a rekombináns FasL, illetve a FasL overexpresszált WSU B sejtvonal sem képes sejthalált indukálni, kaszpáz-9 hiányában azonban a Fas-közvetített sejthalál nem csökkent szignifikáns mértékben Jurkat sejtekben (**33. ábra**). FasL overexpresszált, aktivált Jurkat sejtek felülúszójának hatására azonban míg kaszpáz-8 és kaszpáz-9 hiányában szinte teljesen megszűnt az apoptózis, a FADD hiányos és a vad típusú sejtek közt az apoptózis intenzitásában nem találtunk különbséget. FasL overexpresszált Jurkat sejtek felülúszójával indukált nekrotikus egyik deficiens sejt esetében sem csökkent jelentősen (**33. ábra**). Az aktivált PBMC felülúszójának használata a Jurkat felülúszóval szemben részlegesen eltérő eredményekhez vezetett. A célsejtek apoptózisa kaszpáz-8 és kaszpáz-9 deficiencia mellett FADD hiányos célsejtekben is csökkent. A nekrotikus sejthalál intenzitása FADD és kaszpáz-8 hiányában nem különbözött szignifikánsan a vad típusú sejtektől, azonban kaszpáz-9 hiányában a PI pozitív sejtek aránya is jelentősen csökkent (**33. ábra**). Összességében fenti eredményeink megerősítik a Fas hiányos target sejtekkel megfigyelteket. A felülúszó indukált apoptózis Fas, FADD, a kaszpáz-8 és kaszpáz-9 függőnek bizonyult, míg, a nekrotikus sejthalált nem befolyásolta a Fas, FADD, a kaszpáz-8, vagy a kaszpáz-9 jelenléte. Két esetben figyeltünk meg ettől eltérő eredményt, a Jurkat sejtek felülúszójának apoptózis indukációját a FADD hiánya nem befolyásolta, illetve a PBMC felülúszó kaszpáz-9 hiányában nem okozott nekrotikus sejthalált. (Ez utóbbit hatást az 5/7-dik fejezetben tárgyaljuk).

A Fas-függő jelpályák RIPK1 függő és független módon is sejthalált indukálhatnak. A RIPK1 függő apoptózis a RIPK1-kaspáz-8 komplex kialakulása jellemzi [127]. Megvizsgáltuk, hogy a T-sejt felülúszó mediált apoptotikus és nekrotikus sejthalál RIPK1 hiányában is aktiválódik-e. RIPK1 deficiens és vad típusú Jurkat sejteket kezeltünk rekombináns FasL-dal, valamint FasL-ot overexpresszált Jurkat sejtek vagy aktivált PBMC felülúszóival. A rekombináns FasL által indukált sejthalál egyik vizsgált dózisban sem különbözött szignifikánsan RIPK1 hiányában, illetve jelenlétében (**34. ábra, illetve nem mutatott adat**). Azonban mind a Jurkat, mind a PBMC sejtek felülúszója által indukált apoptózis RIPK1 függőnek bizonyult (**34. ábra**). Míg a Jurkat sejtek felülúszója által kiváltott apoptózis teljes mértékben RIPK1 dependens volt, a PBMC sejtek esetében csak részleges gátlás volt megfigyelhető RIPK1 hiányában. A RIPK1 hiányos sejtekben a nekrotikus sejthalál is csökkent a Jurkat sejtek felülúszójával történő kezelést követően (**34. ábra**). Eredményeinket a DNS fragmentáció mérésével is megerősítettük. A T sejt felülúszó kezelést követően RIPK1 hiányában is kialakul sejthalál, de az apoptózisra jellemző DNS fragmentáció elmarad, csakúgy, mint Fas hiányos sejtekben (**34. ábra**). Összességében kimutattuk, hogy a T sejtek felülúszója által kiváltott apoptózis Fas és RIPK1 függő, szemben a rekombináns FasL-mediált RIPK1 független apoptózissal. A felülúszó Fas független nekrotikus sejthalált is indukál, ami részlegesen RIPK1 függőnek bizonyult.



**33. ábra.** A T sejt felülűsző kaszpáz-8 és kaszpáz-9 függő apoptózist, és FADD és kaszpáz-8 független nekrotikus sejthalált indukál. (A) FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejtvonalat (Jurkat FasL), illetve (B) frissen izolált PBMC-t 100 µg/ml PHA-val aktiváltunk 5 percig. A sejteket friss médiumban inkubáltuk, ezt követően 2 óra múlva a felülűszőt összegyűjtöttük. FADD, kaszpáz-8, vagy kaszpáz-9 hiányos JA3 Jurkat sejtvonalat és ezek vad típusú megfelelőit, mint célsejteket kezeltük a PHA-aktivált sejtek felülűszőjével, vagy M2 antitesttel keresztkötött (20 nM) rekombináns FasL-dal, illetve FasL-ot expresszáló WSU B sejtvonallal helyeztük ko-kultúrába ezekkel a sejtekkel. A sejthalált a subG1 csúcs (üres oszlopok) és a membrán integritás (PI) (szürke oszlopok) mérésével határoztuk meg. Az adatok legalább három független kísérlet átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez kétmintás T próbát használtuk. A szignifikancia értéke; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001.

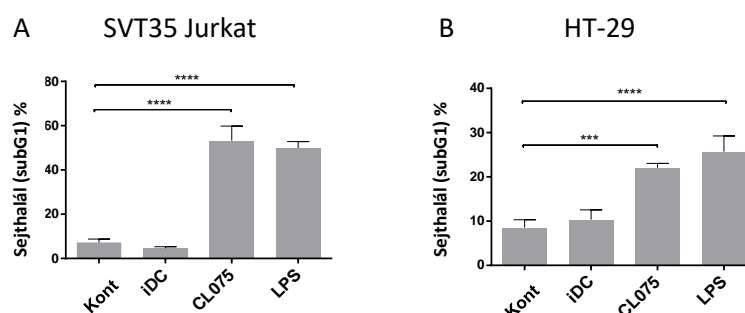


**34. ábra. A T sejt felülúszó RIPK1 függő apoptózist indukál.** (A) FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejtvonalat (Jurkat FasL), illetve (B) frissen izolált PBMC-t 100 µg/ml PHA-val aktiváltunk 5 percig. A sejteket friss médiumban inkubáltuk, ezt követően 2 óra múlva a felülúszót összegyűjtöttük. RIPK1 hiányos SVT35 Jurkat sejtvonalat (RIP-/-) és ennek vad típusú megfelelőjét, mint célsejteket kezeltük a PHA-aktivált sejtek felülúszójával, vagy M2 antitesttel keresztkötött (20 nM) rekombináns FasL-dal. A sejthalált a subG1 csúcs (üres oszlopok) és a membrán integritás (PI) (szürke oszlopok) mérésével határoztuk meg. Az adatok legalább nyolc független kísérlet átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez kétmintás T próbát használtuk. A szignifikancia értéke; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001. (C) Vad típusú, Fas-hiányos és RIPK1-negatív Jurkat sejteket aktiváltuk FasL-t túltermelő Jurkat sejtek felülúszójával, illetve FasL-M2 kezeltük. PI-festést követően a fluoreszcenciát konfokális mikroszkóppal tettük láthatóvá. Öt független mérésből egy reprezentatív kísérlet eredménye látható.

## 5.6 Aktivációt követően az éretlen dendritikus sejtek felülűszója RIPK1-függő sejthalált indukál [128]

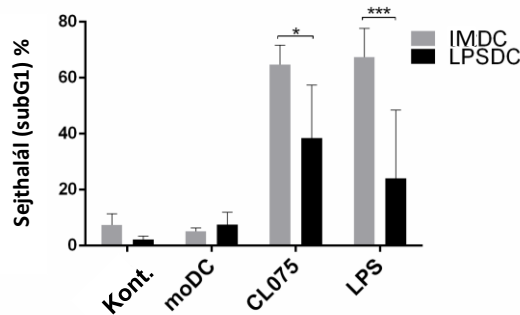
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a dendritikus sejtek citotoxikus funkciójával is rendelkeznek [103], [104], [105]. Nem pontosan ismert azonban, hogy mi lehet ennek a folyamatnak a fiziológiai funkciója és hogy ezt milyen mechanizmusok szabályozzák. Célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk milyen DC populációk képesek sejtölésre, és hogy vajon a T sejtekhez hasonlóan DC-indukált citotoxikus reakciók is RIPK1 függő sejthalált indukálnak-e. Monocitából differenciált dendritikus sejteket (moDC) állítottunk elő és egy-egy extra, illetve intracelluláris fertőzést mimikáló TLR agonistával (LPS-TLR4, CL075-TLR7/8 agonista) stimuláltuk 30 percig az éretlen DC-eket. Az aktivációt követően mostuk a sejteket, majd 2 óra múlva az aktivált sejtek felülűszójával kezeltünk különböző, Jurkat, illetve HT29 target sejteket. A target sejtek sejthalálát a subG1 populáció mérésével monitoroztuk és eredményeinket kaszpáz3/7 aktivitás mérésével is megerősítettük (nem mutatott adat). Kimutattuk, hogy az aktiválatlan DC-ek nem rendelkeztek sejtölő képességgel, azonban mind az LPS, mind a CL075 aktiváció fokozta a DC-ek által termelt felülűszó toxicitását, mutatva, hogy csak PAMP (kórokozó) jelenlétében aktiválódnak a DC-ek sejtölő funkciói (**35. ábra**).

A DC-ek a kórokozó felismerését és bekebelezését követően a másodlagos nyirokszervekbe vándorolnak, ahol prezentálják az antigéneket a T-sejtek számára, így az érett DC-ek funkciója és lokalizációja is teljesen eltér az éretlen DC-ekétől. Ezért megvizsgáltuk, hogy az érett DC-ek aktiválása is citotoxicitást eredményez-e. A szakirodalomban elfogadott protokoll alapján az moDC-t 24 órán keresztül 100ng/ml LPS-sel aktiváltuk, így érett DC-eket állítottunk elő, majd az érett LPS prekondicionált DC-eket aktiváltuk LPS-sel, illetve CL075-tel. Az érett, aktivált DC-ek felülűszója kevésbé volt toxikus a Jurkat sejtekre, mint az éretlen DC-ek felülűszója. Eredményeink alapján a szövetekben lokalizált éretlen DC-ek rendelkeznek elsősorban sejtölő képességgel, így ez a funkció az immunválasz kezdeti szakaszán, a kórokozó felismerésének fázisában lehet fontos (**36. ábra**).

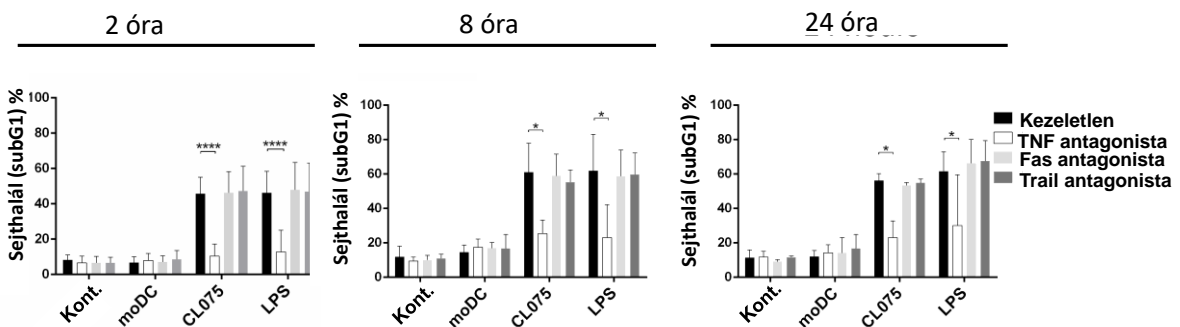


**35. ábra. Az éretlen, aktivált dendritikus sejtek felülűszója citotoxikus tulajdonságú.** (A) SVT35 Jurkat és (B) HT-29 sejteket kezeltünk nem stimulált, illetve CL075 (1µg/ml) vagy LPS (0.5µg/ml) által aktivált dendritikus sejtek felülűszójával. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 5 független mérés átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy az éretlen DC-ek felülűszója által indukált citotoxikus hatásban szerepet játszanak-e a sejthalál ligandumok. Az LPS vagy CL075 aktivációt követően 2, 8, illetve 24 óráig inkubáltuk a sejteket friss médiumban, majd összegyűjtöttük a felülűszót. Az így nyert kondicionált médiumokat előkezeltük TNF, FasL vagy TRAIL inhibitorokkal, majd Jurkat sejteken teszteltük az így nyert felülűszok sejttölő képességét. A **37. ábrán** látható, hogy a DC-ek már két órával az aktivációt követően citotoxikus mediátorokat termeltek és ez a hatás már nem fokozódott a későbbi időpontokat vizsgálva, tehát a sejthalált kiváltó mediátorok az aktivációt követően gyorsan szekretálódnak és termelődésük nem igényel fehérjeszintézist. A sejthalál kiváltásáért elsősorban a TNF szekréció a felelős, ennek gátlása jelentősen, szinte teljesen, megszüntette az LPS és CL075 aktivációt követően kialakuló citotoxikus hatást. A FasL és a TRAIL azonban nem játszik szerepet a folyamatban.



**36. ábra.** Az érett, aktivált DC-ek felülűszója kevésbé citotoxikus mint az éretlen DC-eké. Nem stimulált, CL075 (1µg/ml), illetve LPS (0.5µg/ml) aktivált éretlen (IMDC) és érett (LPSDC) dendritikus sejtek hatását hasonlítottuk össze SVT35 Jurkat sejtek életképességére. A sejteket kezeltük a DC-ek sejtek felülűszójával, majd 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 5 független mérés átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*P < 0,05; \*\*\*P < 0,001.



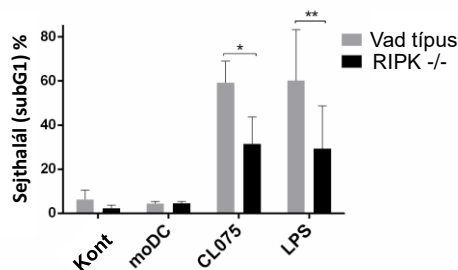
**37. ábra.** Az éretlen dendritikus sejtek felülűszója aktivációt követően TNF-függő sejthalált indukál. Éretlen DC-eket aktiváltunk CL075-tel (1µg/ml) vagy LPS-sel (0.5µg/ml) 30 percig. Az aktivációt követően a DC-eket friss médiumban inkubáltuk 2, 8, 24 órán keresztül. Az összegyűjtött felülűszókat előkezeltük sejthalál ligandumok antagonistáival, TNF:Fc, Fas:Fc vagy TRAIL:Fc-vel egy órán keresztül, majd SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk a nem stimulált és aktivált dendritikus sejtek felülűszójával. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát ±SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*P < 0,05; \*\*\*\*P < 0,0001.

Ismert, hogy a RIPK1-mediált sejthalál folyamatok fokozzák a keresztprezentáció hatékonyságát [112]. RIPK1 deficiens Jurkat sejtek használatával megvizsgáltuk, hogy a DC-indukált sejthalál folyamatok RIPK1-függőek-e. Kimutattuk, hogy a RIPK1 hiányos target sejtek kevésbé érzékenyek a DC felülűszó által kiváltott sejthalálra (**38. ábra**). Mivel a gátlás nem volt teljes mértékű, így eredményeink alapján RIPK1 függő és független sejthalál útvonalak is aktiválódtak. Z-VAD kaspáz inhibitor és nec-1 nekroptózis gátló alkalmazásával bizonyítottuk, hogy a DC-ek felülűszója RIPK1 függő apoptózist indukál, ezzel szemben a nec-1 nem gátolta a sejthalált (nem mutatott adat).

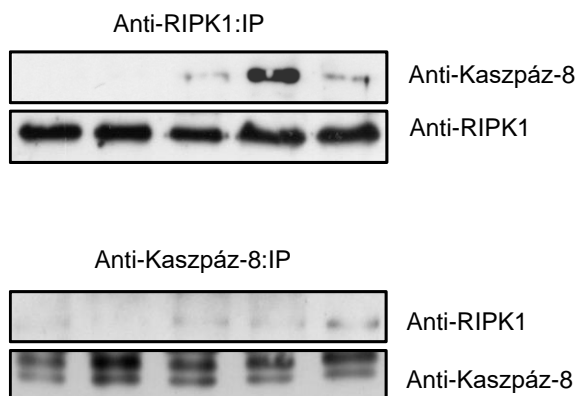
A RIPK1 függő apoptózis jelátvitelének kezdeti lépéseiben a receptor asszociált RIPK1 felelős az aktivációs komplex összeszerelődéséért, így a kaspáz-8 toborzásáért. A RIPK1 és a kaspáz-8 interakcióját immunprecipitációval monitoroztuk. Kimutattuk, hogy LPS és CL075 aktivált DC-ek felülűszójával kezelt Jurkat sejtekben is asszociálódik a RIPK-1 és kaspáz-8, megerősítve, hogy a DC-ek által előlt target sejtekben RIPK1 függő apoptózis indukálódik (**39. ábra**). Eredményeink szerint a DC-ek citotoxikus funkciója, TNF és RIPK1 függő sejthalált indukál, ezáltal feltételezhetően olyan apoptitikus sejteket hozva létre, amelyek elősegítik a keresztprezentáció folyamatait.

A DC-ek a szöveti környezetben különböző funkciójú alpopulációkká differenciálódhatnak. Monocitából differenciált DC-eket dexametazonnal, illetve IFN $\alpha$ -val kezeltünk elő, tolerogén, illetve gyulladásos DC atípusokat létrehozva és teszteltük, hogy a DC-ek eltérő polarizációja hatással van-e a citotoxikus funkcióra. Aktivációt követően vizsgáltuk ezen sejtek felülűszójának citotoxikus képességét. Míg az IFN $\alpha$  előkezelés nem változtatta meg a DC-ek élő funkcióját, a dexametazonnal előkezelt DC-ek citotoxicitása szinte teljesen megszűnt (**40. ábra**), így a tolerogén immunkörnyezetben differenciálódott DC-ek aktivációt követően sem képesek emberi sejtek elpusztítására.

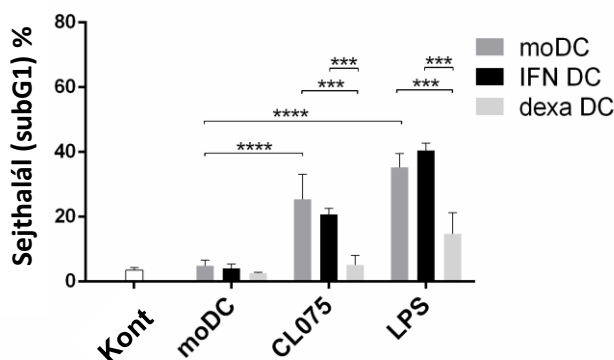
Kimutattuk, hogy a NOD 2 mintázatfelismerő receptor INF $\gamma$  jelenlétében fokozott DC aktivációt és gyulladásos citokin termelést indukál. A fokozott citokin termelés azonban csak az X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) jelenlétében volt megfigyelhető (nem mutatott adat). Eredményeink szerint a mintázatfelismerő receptorok szignálizációja az IAP-ek mennyiségének befolyásolásán keresztül, egyidejűleg szabályozza a DC-ek aktivációs és sejthalál szignálizációjának intenzitást [129].



**38. ábra.** Az éretlen, aktivált dendritikus sejtek felülűszója RIPK1 függő sejthalált indukál. SVT35 Jurkat (wild type) és RIPK1 deficiens SVT35 Jurkat (RIPK1 -/-) sejteket kezeltünk nem stimulált, CL075 (1  $\mu$ g/ml) vagy LPS-(0.5  $\mu$ g/ml) aktivált dendritikus sejtek felülűszójával. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 5 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .



**39. ábra.** Az éretlen, aktivált dendritikus sejtek felülűszója RIPK-Kaspáz-8 asszociációt indukál. SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk nem stimulált, CL075 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) vagy LPS (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) aktivált dendritikus sejtek felülűszójával. Pozitív kontrollként TNF (20ng/ml) és BV6 SMAC mimetikum keverékével stimuláltuk a sejteket egy órán keresztül. Anti-RIPK1, vagy anti-caspase-8 immunprecipitációt követően anti-RIPK1 és anti-caspase-8 ellenanyagokkal mutattuk ki a kapcsolódó molekulákat western bloton. A bemutatott eredmények egy reprezentatív mérés eredményeit mutatják 3 független mérésből.



**40. ábra.** A tolerogén dendritikus sejtek felülűszója nem citotoxikus tulajdonságú. SVT35 Jurkat sejteket kezeltünk nem stimulált, CL075 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) vagy LPS (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) által aktivált kontroll DC-k (moDC), IFN-nel előkezelt DC-k (IFN DC) vagy a dexametazonnal előkezelt (dexa) DC-k felülűszóival. 24 óra múlva meghatároztuk a sejthalál intenzitását a subG1 populáció mérésével. A bemutatott eredmények 3 független mérés átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez egyutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\*\*P < 0,001; \*\*\*\*P < 0,0001.

## 5.7 A kaspáz-9 szabályozza a nekroptózis kialakulását [130]

A T sejt felülszó citotoxikus hatásainak vizsgálatakor kapott eredményeink alapján a kaspáz-9 hiányos Jurkat sejteken jelentősen csökken a CTL által indukált nekrotikus sejthalál intenzitása is (**33. ábra**). A nekroptózis és a sejthalál receptor-indukált apoptózis kapcsolata intenzíven vizsgált terület, azonban a mitokondriális apoptózis és a nekroptózis interakciója szinte egyáltalán tanulmányozott. Kaspáz-9 hiányos és vad típusú Jurkat sejteken nekroptózist indukáltunk a szakirodalomban leggyakrabban használt TNF/SMAC mimetikum/kaspáz inhibitor koktél segítségével (TBZ), ahol a TNF a sejthalál stimulusért, a SMAC mimetikum (esetünkben BV6) a RIPK1 ubiquitinációjának gátlásáért, a kaspáz inhibitor (Z-VAD) pedig az apoptotikus útvonal gátlásáért felelős. A TBZ kezelés jelentős sejthalált indukált vad típusú Jurkat sejteken, ami gátolható volt necrostatin 1-gyel, a nekroptózis specifikus inhibitorával. Kaspáz-9 hiányos sejteken azonban a TBZ stimulus nem okozott sejthalált (**41. ábra**), ami arra utal, hogy a kaspáz-9 szerepet játszik a nekroptózisban. A nekroptózis jelátvitelében legfontosabb molekulák expressziója azonos volt a vad típusú és kaspáz-9-et nem tartalmazó Jurkat sejtvonalakban (**41. ábra**). Azért, hogy a kaspáz-9 szerepét a nekroptózisban kétséget kizáróan bizonyítsuk, a kaspáz-9 deficiens Jurkat sejtekbe retranszfektáltuk a kaspáz-9 molekulát, ami helyreállította a sejtek nekroptózis érzékenységét (**41. ábra**). Eredményeinket további sejthalál ligandumok használatával (FasL és TRAIL) is megerősítettük, a kaspáz-9 hiánya bármely sejthalál receptor stimulálásakor –BV6 és Z-VAD jelenlétében– gátolta a nekroptózis kialakulását, míg a kaspáz-9 retranszfektációja minden esetben visszaállította a sejtek nekroptózis érzékenységét (nem mutatott adat). Felmerül annak a lehetősége is, hogy a kaspáz-9 módosítja SMAC mimetikum működését és ezen keresztül szabályozza a nekroptózist. Ezért intenzív FASL stimulust alkalmazva, FasL-ot overexpresszáló WSU sejtek segítségével, Z-VAD jelenlétében, de BV6 nélkül indukáltunk sejthalált (**41. ábra**). Nec1 használatával bizonyítottuk, hogy ilyen körülmények között valóban nekroptózis aktiválódott. Vad típusú, kaspáz-9 hiányos és retranszfektált sejtvonalakon megfigyelt eredményeink szerint a SMAC mimetikum hiányában kialakuló nekroptózishoz is szükséges volt a kaspáz-9 jelenléte. Kísérleteink következő részében megvizsgáltuk, hogy a kaspáz-9 hiánya más sejthalál útvonalakra is hatással van-e. A kaspáz-9 hiánya nem befolyásolta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> valamint a ionomicin indukált nekrozist, valamint a BV6 és TNF aktivált, RIPK1 függő apoptózist, amely kaspáz-3 aktivációval jár (nem mutatott adatok). Eredményeink szerint így a kaspáz-9 a mitokondriális apoptózis mellett a nekroptózis szabályozója, de nem befolyásolja a nekrozist és a RIPK1 függő apoptózist.

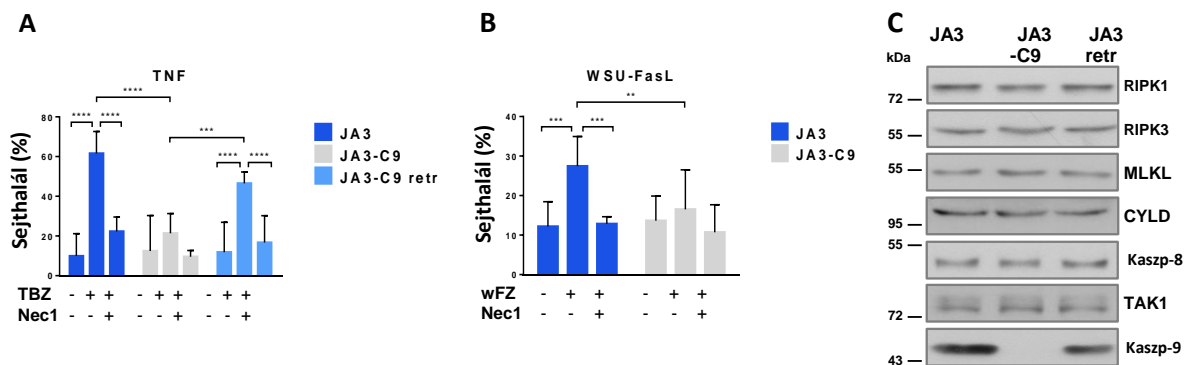
A kaspáz-9 szerepének tisztázásához egy további kaspáz-9 hiányos sejtvonalon is megvizsgáltuk a nekroptotikus sejthalált. Vad típusú és kaspáz-9 deficiens egér fibroblaszt (MEF) sejteken FasL, BV6 és Z-VAD használatával nekroptózist indukáltunk. A Jurkat sejteken megfigyelteknek megfelelően kaspáz-9 hiányában nem alakult ki nekroptózis (**42. ábra**). A TBZ stimulus sem okozott nekroptózist kaspáz-9 hiányos MEF sejteken (nem mutatott adat). Cycloheximide (CHX) használatával jelentősen



fokozható a TNF-indukált sejthalál, így MEF sejteken SMAC mimetikum nélkül, TNF, CHX és Z-VAD jelenlétében is intenzív nekroptózis aktiválható. Eredményeink szerint ez a stimulus kombináció sem okozott sejthalált kaspáz-9 hiányában (nem mutatott adat).

A nekroptózis nem csak sejthalál receptorok, de mintázatfelismerő receptorok aktivációjának hatására is kialakul. Vad típusú és kaspáz-9 hiányos MEF sejteken LPS és Z-VAD használatával indukáltunk nekroptózist. Kimutattuk, hogy a kaspáz-9 hiánya jelentősen csökkentette az LPS kiváltott nekroptózist is (42. ábra). Irodalmi adatoknak alapján ismert ([131]), hogy az emberi herpesz simplex vírus (HSV) egér MEF sejteken nekroptózist okoz. Kísérleteinkben HSV stimulust követően is szignifikánsan kevesebb nekroptotikus sejthalál alakult ki kaspáz-9 hiányos MEF sejteken, mint vad típusú megfelelőin. A nekroptózis kulcs molekuláinak (RIPK1, RIPK3, MLKL, CYLD, TAK1, kaspáz-8) expresszióját MEF sejteken is ellenőriztük, és nem találtunk különbséget a vad típusú és kaspáz-9-et nem tartalmazó MEF sejtvonalak között (nem mutatott adat). Összességében, eredményeink szerint a kaspáz-9 részt vesz a sejthalál receptorok és mintázat felismerő receptorok aktivációját követően kialakuló nekroptózis szabályozásában is, szerepét emberi és egér sejtekben is bizonyítottuk.

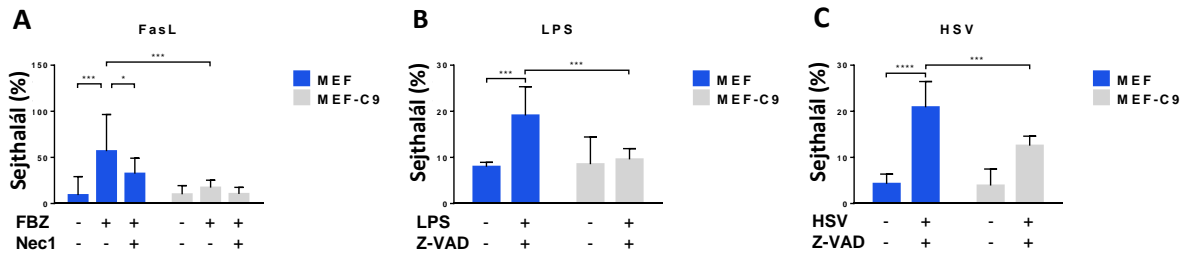
Következő lépésben tisztázni kívántuk, hogy a kaspáz-9 a nekroptotikus jelpálya melyik lépésében kapcsolódik a nekroptózis útvonalához. A nekroptózis során a receptor aktivációt követően a RIPK1 és a RIPK3 molekulák asszociálódnak és a létrehozzák a nekroszóma nagy méretű molekula komplexét.



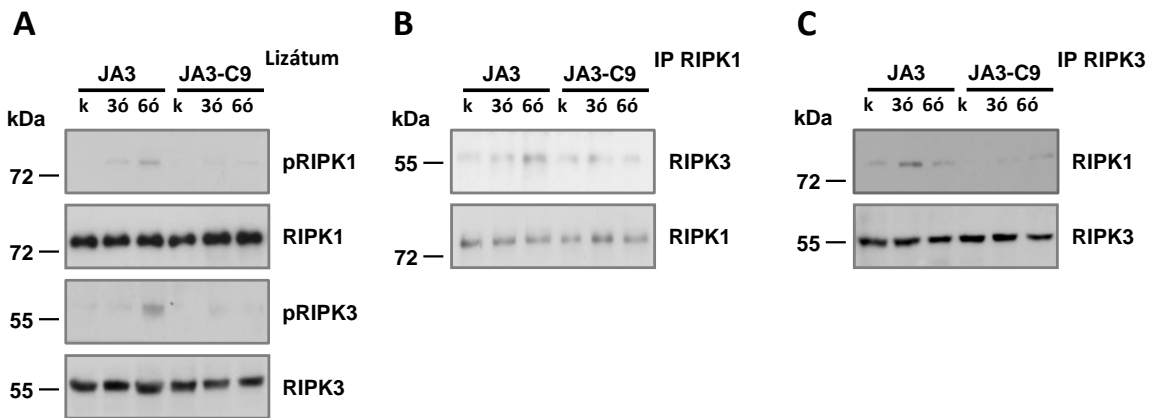
**41. ábra. A kaspáz-9 szerepet játszik a sejthalál receptorok által közvetített nekroptózisban.** (A) JA3 sejteket, annak kaspáz-9 hiányos megfelelőjét (JA3-C9) és a kaspáz-9-cel újratranszfektált JA3-C9 sejteket (JA3 retr) 10  $\mu$ M Z-VAD-dal, 40  $\mu$ M necrostatin-1-gyel (Nec-1) és 1  $\mu$ M BV6 1 órában előkezeltünk, majd 50 ng/ml rekombináns humán TNF $\alpha$ -val aktiváltunk. (B) A különböző JA3 sejteket 10  $\mu$ M Z-VAD-dal előkezeltük és cell tracker festett humán FasL-t expresszáló WSU B-sejtvonal (wF) jelenlétében tenyésztettük 1:5 arányban. A sejthalál mértékét 24 óra elteltével PI-festéssel határoztuk meg. Az adatok legalább három független kísérlet átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . (C) A jelzett molekulák expresszióját teljes sejtlizátumból Western blottal határoztuk meg, az ábra három független kísérletből egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja be.

A komplexben mind a RIPK1 mind a RIPK3 foszforilálódik [34]. Ezért vad típusú és kaspáz-9 hiányos Jurkat sejteken összehasonlítottuk a RIPK1 és RIPK3 molekulák foszforilációját, valamint a RIPK1-

RIPK3 kapcsolat intenzitását TBZ stimulust követően. Kimutattuk, hogy TBZ aktiváció a RIPK1 és RIPK3 foszforilációját is indukálja vad típusú Jurkat sejteken, azonban ez a foszforiláció nem mutatható ki a kaszpáz-9 hiányos sejt-párban (43. ábra). Ehhez hasonlóan a RIPK1-RIPK3 asszociáció is kimutatható volt a TBZ stimulust követően 3-6 órával a vad típusú sejteken, azonban sem RIPK1 sem RIPK3 immunprecipitációt követően nem tudtunk érdemi interakciót kimutatni a RIPK1 és RIPK3 molekulák között kaszpáz-9 deficiens sejteken (43. ábra).



**42. ábra. A kaszpáz-9 szabályozza a sejthalál és mintázatfelismerő receptorok által közvetített nekroptózist a MEF sejtekben.** (A) MEF sejteket és annak kaszpáz-9 hiányos megfelelőjét (MEF-C9) 10  $\mu$ M Z-VAD-dal, 40  $\mu$ M necrostatin-1-gyel (Nec-1) és 1  $\mu$ M BV6 1 órán át előkezeltünk, majd 20 ng/ml FLAG-taggel jelölt FasL-dal aktiváltuk., amit M2 anti-flag ellenanyaggal oligomerizáltunk (B) A MEF és MEF-C9 sejteket 50  $\mu$ M Z-VAD-dal előkezeltük 1 órán keresztül, majd 100 ng/ml LPS-sel aktiváltuk, vagy (C) humán herpeszvírus 1-gyel fertőztük MOI 5-tel. A sejthalál mértékét minden esetben 24 óra elteltével PI-festéssel határoztuk meg. Az adatok legalább három független kísérlet átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

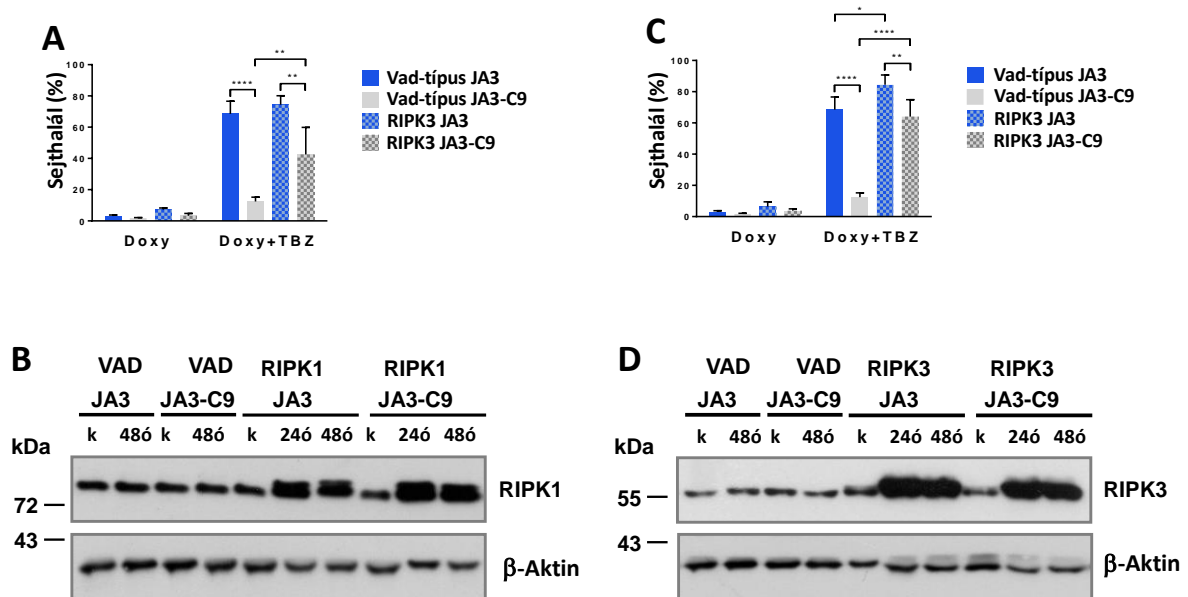


**43. ábra A kaszpáz-9 szabályozza a nekroszóma összeszerelődését.** (A) A JA3 és JA3-C9 sejteket 10  $\mu$ M Z-VAD-dal és 1  $\mu$ M BV6-tal előkezeltük 1 órán át, majd a jelzett ideig aktiváltuk. 50 ng/ml humán TNF $\alpha$ -val. Teljes sejt-lizátumból detektáltuk a RIPK1 (S166) és a RIPK3 (S227) foszforilációját. (B) Teljes sejt-lizátumból anti-RIPK1 vagy (C) anti-RIPK3 antitestekkel végzett immunprecipitációt követően az asszociálódott molekulákat Western blottal detektáltuk. Az ábra három független kísérletből egy-egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatják be.

Ismert, hogy a nekroptózist a RIPK3 overexpressziója is képes aktiválni [132], ezért vad típusú és kaszpáz-9 hiányos Jurkat sejteken RIPK1 vagy RIPK3 overexpressziót hoztunk létre. A spontán sejthalál elkerülése érdekében a fenti fehérjéket expresszáló plazmidok doxiciklin függő promóterrel

rendelkeztek, ezért csak doxiciklin jelenlétében fokozódott a RIPK1, vagy a RIPK3 termelődése. A módosított sejtekben 24-48 órával a doxicilin kezelést követően jelentősen fokozódott a RIPK1, illetve a RIPK3 expressziója (44. ábra.B/D). TBZ stimulus követően vad típusú sejtek nekroptózis érzékenységében sem a RIPK1 sem a RIPK3 overexpressziója nem okozott szignifikáns változást, az indukált, intenzív 70-80%-os sejthalál már nem növekedett, azonban a kaspáz-9 hiányos sejtekben a RIPK1 és a RIPK3 megnövekedett expressziója is részlegesen helyreállította a sejtek nekroptózis érzékenységét, szignifikánsan fokozta a sejthalált (44. ábra). Fenti eredményeink alapján a kaspáz-9 elősegíti a nekroszóma összeszerelődését, valamint a nekroszóma komponensek overexpressziója kompenzálta a kaspáz-9 hiányát.

A következő lépésekben vizsgáltuk a kaspáz-9 direkt interakcióját a nekroszóma egyes komponenseivel, azonban a kaspáz-9 és a RIPK1 asszociációját nem tudtunk kimutatni, míg a kaspáz-9 és a RIPK3 között gyenge kötődést figyeltünk meg 3 órával a nekroptotikus TBZ stimulust követően (nem mutatott adat). Mivel a kaspáz-9 közvetlen kapcsolódása a nekroszómához nem/alig volt megfigyelhető feltételeztük, hogy a nekroszóma kialakulását szabályozó további molekulákat befolyásolhatja a kaspáz-9.



**44. ábra A RIPK1 vagy a RIPK3 overexpressziója kompenzálja a kaspáz-9 hiányát a nekroptózis szabályozásában.** JA3 sejtekben indukáltuk (A) a RIPK1 vagy (C) a RIPK3 doxiciklin függő overexpresszióját. A sejteket 2  $\mu$ g/ml doxiciklinnel aktiváltuk 24 órán keresztül, majd 10  $\mu$ M Z-VAD-dal és 1  $\mu$ M BV6-tal előkezeltük 1 óráig, és 50 ng/ml humán TNF $\alpha$ -val aktiváltuk. 24 órával a TNF aktivációt követően a sejthalált PI festés alapján határoztuk meg. Az adatok legalább három független kísérlet átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . A sejteket a jelzett ideig 2  $\mu$ g/ml doxiciklinnel előkezeltük, majd (B) a RIPK1, vagy (D) a RIPK3 expresszióját teljes sejtlizátumból Western blottal detektáltuk. Az B és D ábrák három független kísérletből egy-egy reprezentatív kísérlet eredményt mutatják.

A HSP90, mint a nekroszóma összeszerelődésének pozitív, míg a Ppm1b foszfatáz és az Aurka kináz A ennek negatív szabályozójaként ismert [133], [45], [46]. A kaszpáz-9 illetve a HSP90 vagy a Ppm1b között nem tudunk a nekroptotikus stimulus függő interakciót kimutatni (nem mutatott adat), azonban az AURKA és kaszpáz-9 asszociációját figyeltük meg 3-6 órával a TBZ aktivációt követően (**45. ábra.A/B**). Eredményeink alapján az AURKA foszforilációja is megnövekedett a nekroptotikus stimulust követően, kaszpáz-9 függő módon (**45. ábra.E**). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy az AURKA, illetve szubsztrátjának a GSK3 $\beta$ -nek inhibitorai egyaránt fokozzák a nekroptózist, felszabadítva a jelpályát az AURKA-mediált gátlás alól [46].

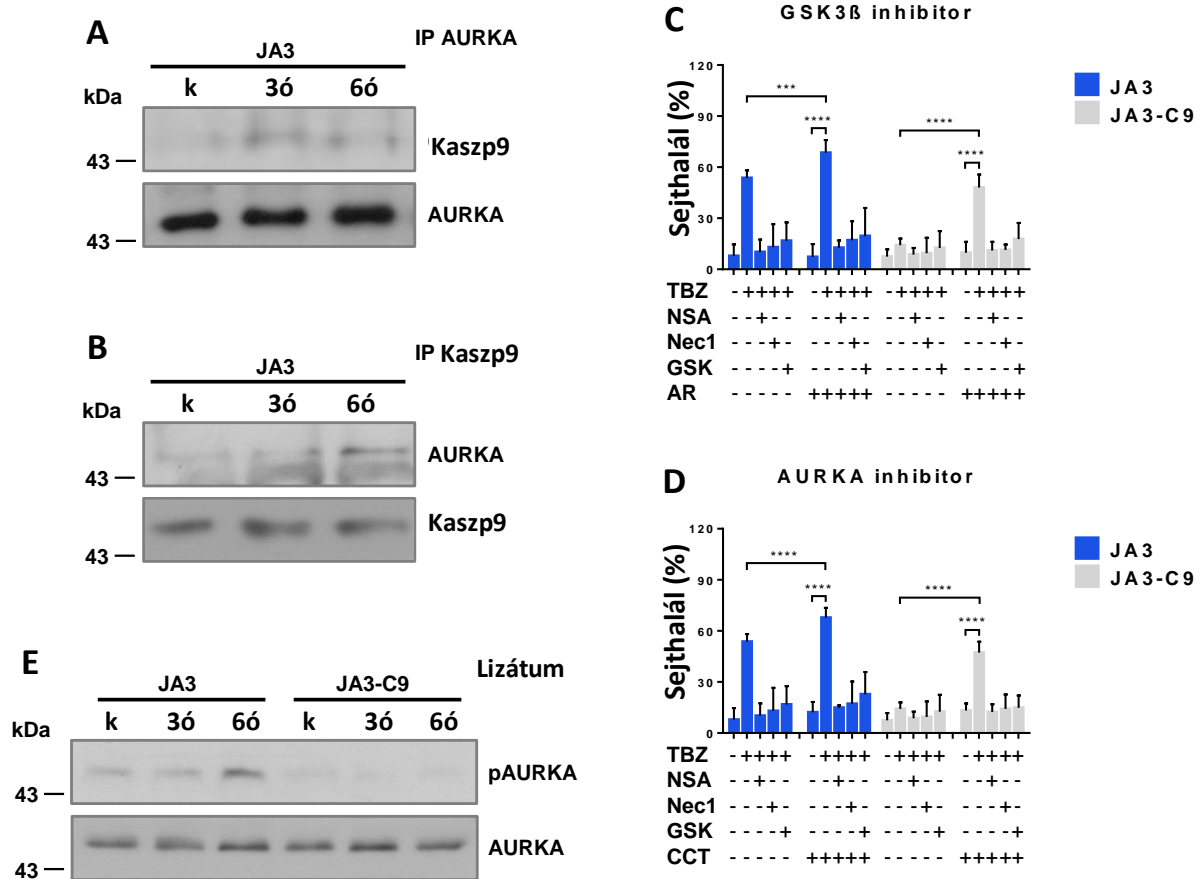
Feltételeztük, hogy a kaszpáz-9 az AURKA szabályozásán keresztül befolyásolja a nekroptózis intenzitását. Megvizsgáltuk, hogy az AURKA, illetve a GSK3 $\beta$  inhibitorok hatással vannak-e a kaszpáz-9 függő szabályozásra. TBZ stimulust követően, mind az AURKA inhibitor (CCT137690), mind a GSK3 $\beta$  inhibitor (AR-A014418) fokozta a sejthalál mértékét. Az AURKA vagy GSK3 $\beta$  inhibitorok használata egyaránt helyreállította a kaszpáz-9 hiányos Jurkat sejtek nekroptózis érzékenységét (**45. ábra.C/D**). Mivel az így kialakult sejthalál RIPK1 (nec1), RIPK3 (GSK'872) és MLKL (necosulfonamide, NSA) inhibitorokkal is gátolható volt, bizonyítottuk, hogy a használt kondíciók közt is nekroptózis alakult ki (**45. ábra C/D**). Eredményeink alapján, amennyiben az AURKA kináz nekroptózist gátló hatása nem érvényesül a nekroptózishoz nincs szükség a kaszpáz-9 jelenlétére.

Miután a kaszpáz-9 szerepét a nekroptózisban *in vitro* humán és egér sejtvonalakon is kimutattuk, eredményeinket *in vivo* is szeretnénk volna megerősíteni. Mivel a kaszpáz-9 hiánya perinatális letálisát okoz, ezért egy a kaszpáz-9 génben LoxP szekvenciákat tartalmazó egértörzset hoztunk létre. (A munka prof. Virág László DE és prof Szabó Gábor KOKI munkacsoportjaival kollaborációban készült). Irodalmi adatok alapján a cerulein indukált pankreatitisz sem RIPK3, sem MLKL hiányos egerekben nem alakul ki, mutatva, hogy a cerulein indukált nekroptózis iniciálja a gyulladásos reakciókat [134],[135].

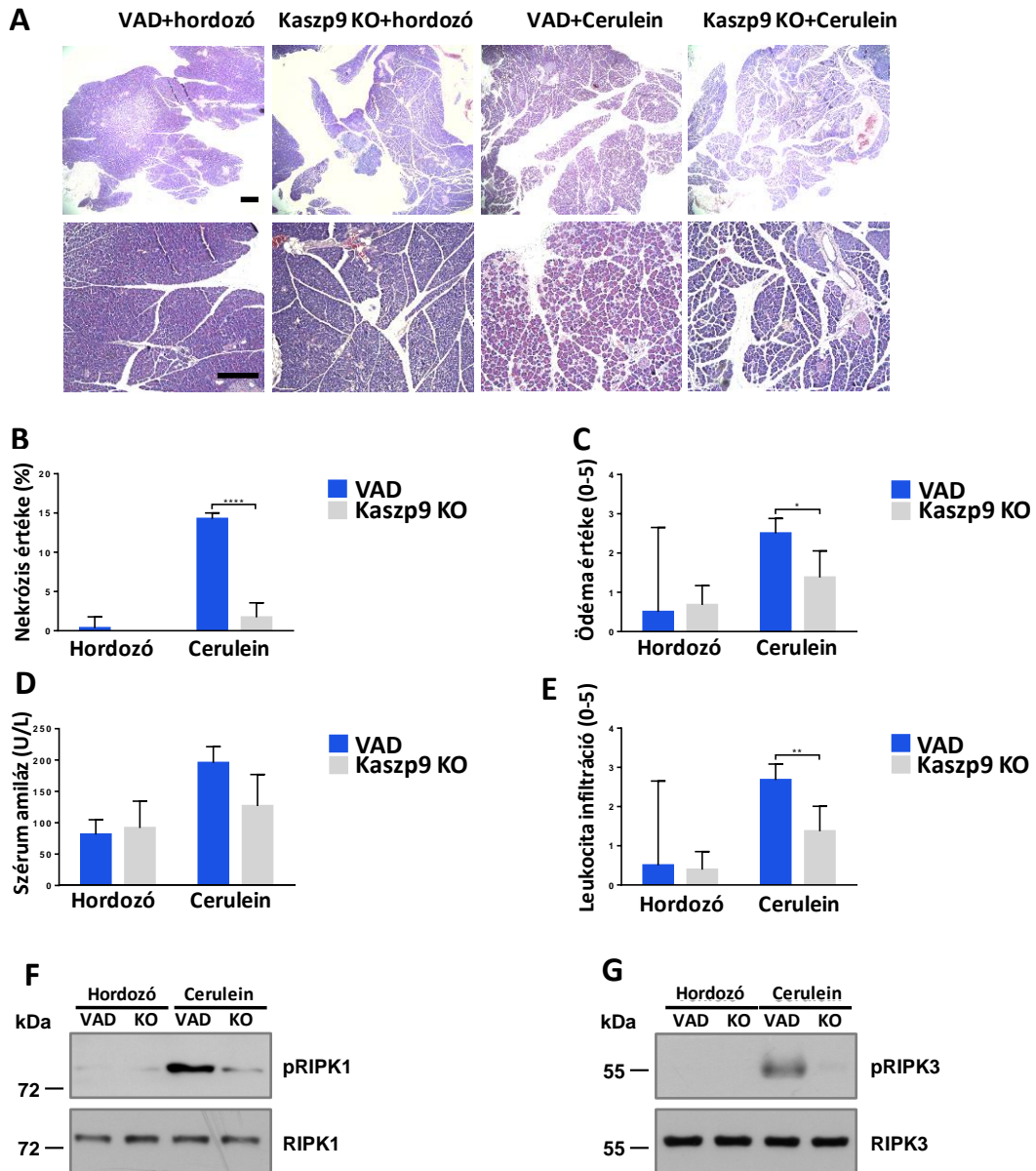
A Cela1-Cre egereket keresztezve a kaszpáz-9 szekvenciában LoxP-t hordozó egértörzssel a hasnyálmirigy acinus sejteiben kaszpáz-9-et nem expresszáló egértörzset hoztunk létre Maléth József (Szegedi Egyetem) munkacsoportjával közösen. A kaszpáz-9 jelenlétét fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk, megerősítettük, hogy a létrehozott egértörzs acinus sejteji valóban kaszpáz-9 deficiensek (nem mutatott adat).

Cerulein óránkénti, 8-szor ismételt injektálását követően a vad típusú állatok pankréájában nekrosis és gyulladás alakult ki, amit a szövettani metszeteken az ödéma kialakulásával, a nekrotikus terület százalékaival, leukocita infiltrációval, valamint a szérum amiláz aktivitás növekedésével jellemeztünk. Az acinus sejtekben kaszpáz-9 hiányos állatok esetében a gyulladásos markerek mindegyike jelentősen csökkent (**46. ábra**). Azért, hogy bizonyítsuk, hogy a gyulladást kiváltó nekrosis valóban nekroptózis következménye a vad típusú és kaszpáz-9 hiányos egerek pankréájából származó mintákban western

blottal detektáltuk a RIPK1 és a RIPK3 foszforilációját. Cerulein indukciót követően vad típusú állatokban fokozódott a RIPK1 és RIPK3 foszforilációja, mutatva, hogy nekroptózis alakult ki, azonban kaszpáz-9 hiányában sem a RIPK1, sem RIPK3 foszforilációja nem volt kimutatható (46. ábra). Összességében a kaszpáz-9 hiányos acinus sejtekkel rendelkező egértörzzsel végzett kísérleteink *in vivo* is bizonyítékát szolgáltatták a kaszpáz-9 nekroptózisban játszott szerepének.



**45. ábra.** Az Aurora Kinase A inhibitor helyreállítja a TNF/BV6/Z-VAD által kiváltott sejthalált a kaszpáz-9 hiányos Jurkat sejtekben. (A-B) A JA3 és JA3-C9 sejteket 10  $\mu$ M Z-VAD-dal és 1  $\mu$ M BV6-tal előkezeltük 1 órán át, majd a jelzett ideig 50 ng/ml humán TNF $\alpha$ -val aktiváltuk. (A) Anti-AURKA-val vagy (B) anti-kaspáz-9-cel végzett immunprecipitációt követően az asszociálódó molekulákat Western-blottal detektáltuk. Az ábra három független kísérletből egy reprezentatív kísérlet eredményt mutatja. (C) A JA3 és JA3-C9 sejteket 20  $\mu$ M AR-A014418 (GSK3 $\beta$  inhibitor) vagy (D) 2,5  $\mu$ M CCT137690 (AURKA inhibitor) 10  $\mu$ M Z-VAD, 1  $\mu$ M BV6, 1  $\mu$ M NSA 1, 40  $\mu$ M Nec-1 és 7,5  $\mu$ M GSK'872 kombinációival előkezeltük 1 órán át, majd 50 ng/ml humán TNF $\alpha$ -val aktiváltuk. 24 óra elteltével a sejthalál mértékét PI-festéssel határoztuk meg. Az adatok legalább három független kísérlet átlagát  $\pm$ SD mutatják. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\*\* $P$  < 0,001, \*\*\*\* $P$  < 0,0001. (E) Az AURKA (T288) foszforilációját teljes sejtlizátumból Western blottal mutattuk ki. Az ábra három független kísérletből egy reprezentatív kísérlet eredményt mutatja.



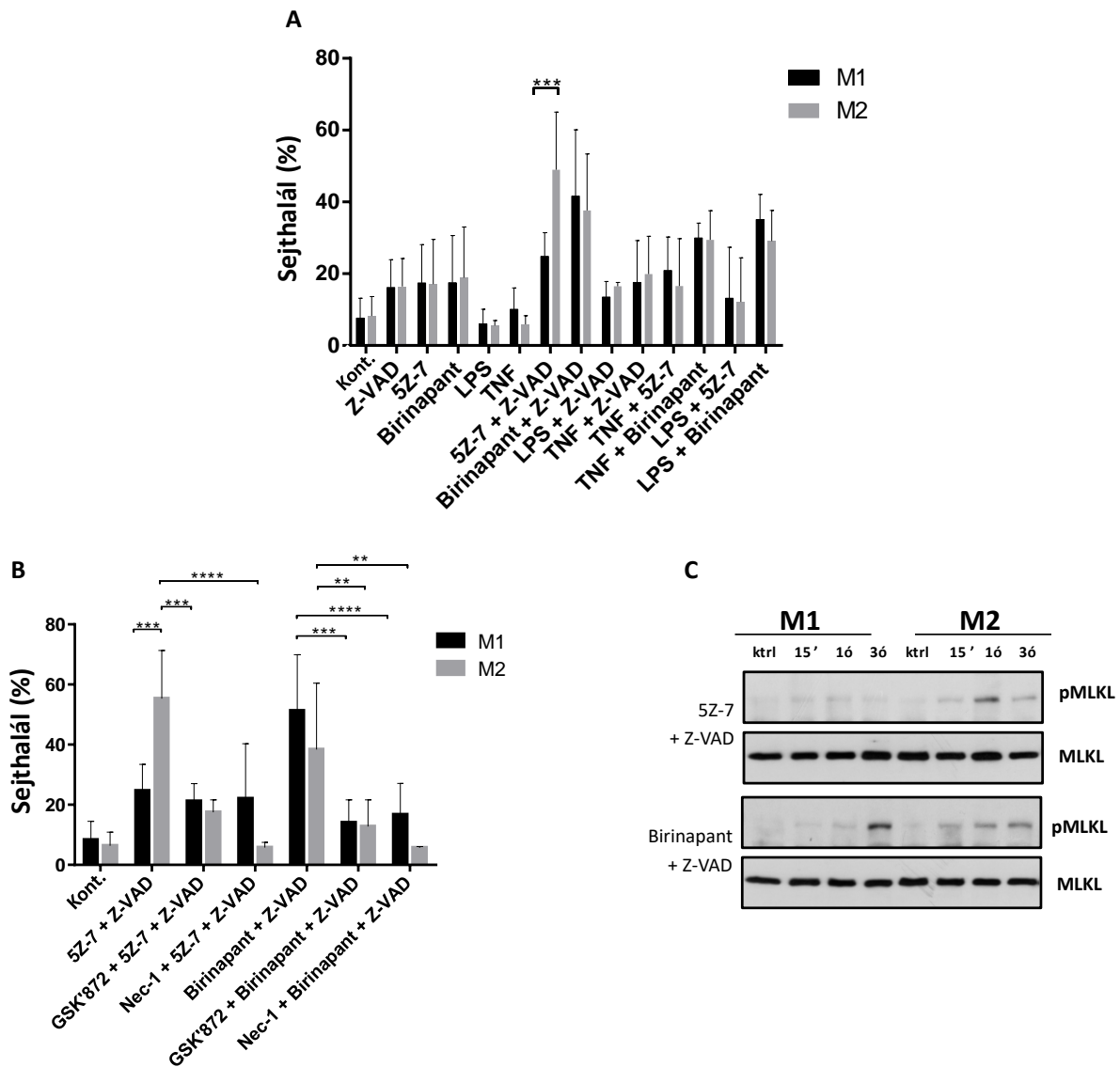
**46. ábra.** A kaszpáz-9 leütése a hasnyálmirigy acinus sejteiben csökkenti a cerulein által kiváltott akut pancreatitis súlyosságát. (A) A hasnyálmirigy szövetének reprezentatív képei cerulein-indukált hasnyálmirigy-gyulladásban. Vad típusú és a hasnyálmirigy acinus sejtekben kaszpáz-9 géninaktivált egereket 8 óránként intraperitoneálisan fizioológias sóoldattal (vivőanyag), vagy 50 µg/ttkg cerulein-nel injektáltunk. Skála jelzés: 100 µm. (B-E) Az ödéma, a gyulladós sejtinfiltráció, a nekrotikus terület %-ának szövettani pontszámait értékeltük, valamint mértük a szérum amiláz aktivitásának szintjét. Az ábrák 6-8 egérből származó adatok átlagát mutatják csoportonként ±SD. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01, \*\*\*\*P < 0,0001. (F-G) A RIPK1 (S166) és RIPK3 (Thr231/Ser232) foszforilációját a hasnyálmirigyszövetből izolált teljes sejtizátumból detektáltuk. Az ábra három független kísérletből egy reprezentatív kísérlet eredményt mutatja. (A teljes ábrán a vad típus Cre hiányos LoxP/LoxP állatokra vonatkozik)

## 5.8 Az anti-inflammatórikus makrofágok érzékenyebbek a TAK1 inhibitor indukált nekroptózisra, mint a proinflammatórikus makrofágok [136]

A makrofág alpopulációk arányának szabályozása több kórkép esetében is nagy jelentőséggel bírhat. Intenzíven vizsgált terület az alpopulációk differenciációjánk, vagy kemotaxisának *in vivo* befolyásolása, azonban az egyes altípusok életképességéről kevesebb adat ismert. Kísérleteinkben arra voltunk kíváncsiak, hogy az M1, illetve M2 altípusok sejthalál érzékenységében megfigyelhető-e különbség. Ennek tesztelésére PBMC-ből izolált humán monocitákat *in vitro* 5 napig MCSF jelenlétében tenyésztve makrofágokat nyertünk, majd IFN $\gamma$  és LPS, illetve IL-4, IL-10 és TGF $\beta$  jelenlétében M1, vagy M2 típusú sejtekké differenciáltattuk azokat. Az alpopulációkat CD80 M1 marker, valamint CD206 és CD209 M2 markerek sejtfelszíni expressziójával, továbbá IL12 és IL10 produkció mérésével jellemeztünk. Az általunk differenciáltatott makrofágok a vártak megfelelően rendelkeztek az alosztályok szakirodalomban elfogadott markereivel (nem mutatott adat) [137].

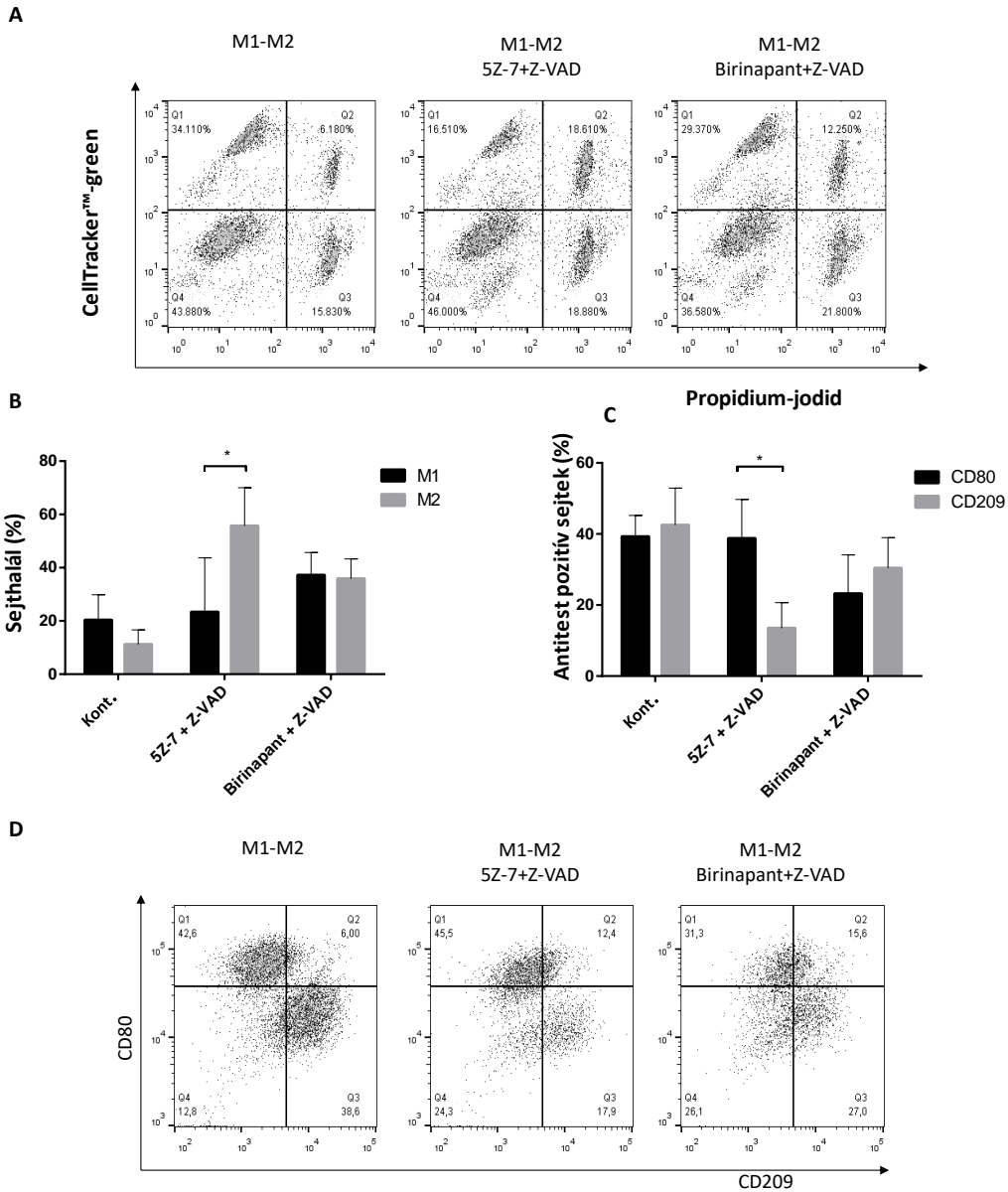
Ezt követően az egyes makrofág altípusokat különféle apoptotikus, LPS, TNF, SMAC mimetikum (birinapant) és TAK1 inhibitor (5Z-7), valamint a fenti szereket Z-VAD-dal kombinálva nekroptotikus stimulusokkal kezeltünk. Az 5Z-7 és Z-VAD kombinációja szignifikánsan nagyobb mértékű sejthalált eredményezett M2, mint M1 sejtekben, míg a többi kezelésnél nem találtunk eltérést az M1 és M2 makrofág alpopulációk között, így a többi nekroptózist indukáló kezelésnél sem (**47. ábra**)... Mind a RIPK1 inhibitor (Nec-1), mind a RIPK3 inhibitor (GSK-872) gátolta az 5Z-7 és Z-VAD indukált sejthalált, bizonyítva, hogy valóban nekroptózis alakult ki (**44. ábra**). Vizsgáltuk az MLKL foszforilációját is a kétféle makrofágban, mint a nekroptózis molekuláris markerét. Míg az 5Z-7 és Z-VAD az M2 sejtekben intenzívebb MLKL foszforilálódást okozott, míg a birinapant és Z-VAD kombinációja mindkét makrofág alpopulációban MLKL foszforilálódást és nekroptózist indukált (**47. ábra**).

Annak eldöntésére, hogy az 5Z-7 és Z-VAD aktiváció direkt módon okoz-e nekroptózist az M2 sejteken, vagy egy, csak erre a sejtípusra jellemző autokrin citotoxikus mediátor termelődését indukálja, az M1 és M2 sejteket együtt tenyésztettük, az M2 makrofágokat cell tarcker festékekkel megjelölve. Az M1 és M2 sejtek ko-kultúrájában 5Z-7 és Z-VAD, vagy birinapant és Z-VAD kombinációjával nekroptózist indukáltunk. Az 5Z-7 és Z-VAD stimulus a kevert sejt-kultúrában is szignifikánsan intenzívebb sejthalált okozott M2, mint M1 sejteken, ugyanakkor a birinapant és Z-VAD mindkét sejt-populációban egyformán hatásosnak bizonyult (**48. ábra**). A kevert sejt-kultúrában az életben maradó sejtek között az 5Z-7 és Z-VAD kezelés hatására a CD209 magas expressziójával jellemezhető M2 altípus aránya jeletoesen csökkent a CD80 (M1 marker) pozitív sejtekéhez képest, míg a birinapant és Z-VAD kezelés nem változtatta meg a két makrofág típus arányát (**48. ábra**). Eredményeink alapján azonosítottunk egy sejthalál formát, amely szelektíven az M2 sejtek nekroptózist indukálja, továbbá különböző nekroptotikus stimulusok eltérő viselkedését figyeltük meg.



**47. ábra A TAK1 inhibitor intenzívebb nekroptózist indukál M2, mint M1-sejteken.** (A) Az *in vitro* differenciált humán M1 és M2 makrofágokat 100 ng/ml LPS-sel, 60 ng/ml TNF-fel, 0,5  $\mu$ M birinapanttal és 1  $\mu$ M 5Z-7-oxozeaenollal stimuláltuk 50  $\mu$ M Z-VAD jelenlétében vagy hiányában. (B) Az M1 és M2 sejteket 7,5  $\mu$ M GSK'872 RIPK3 inhibitorral és 38,5  $\mu$ M Necrostatin-1-gyel előkezeltük 1 óráig, majd 50  $\mu$ M Z-VAD-ot és 0,5  $\mu$ M birinapant-ot, vagy 1  $\mu$ M 5Z-7-oxozeaenollal adtuk hozzájuk. 24 óra elteltével a sejthalált PI-festéssel határoztuk meg. Az ábrák legalább három független kísérlet átlagát és SD-jét mutatják. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$ . (E) A makrofág populációkat 50  $\mu$ M Z-VAD jelenlétében 0,5  $\mu$ M birinapanttal, vagy 1  $\mu$ M 5Z-7-oxozeaenollal kezeltük a jelzett ideig. Az MLKL foszforilációt (S358) WB-on mutattuk ki. Az ábra egy reprezentatív kísérlet eredményét mutatja három független kísérletből.

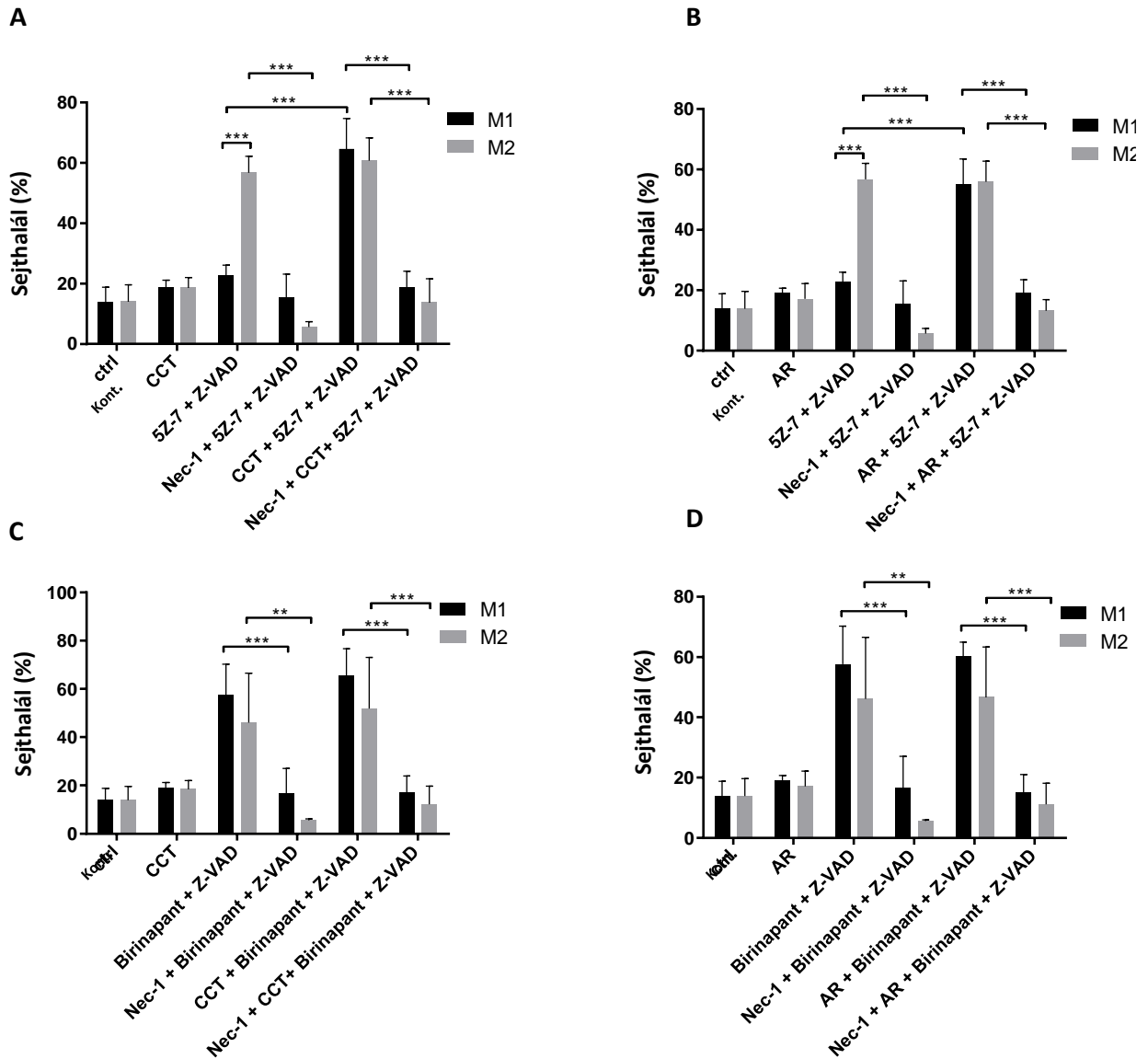




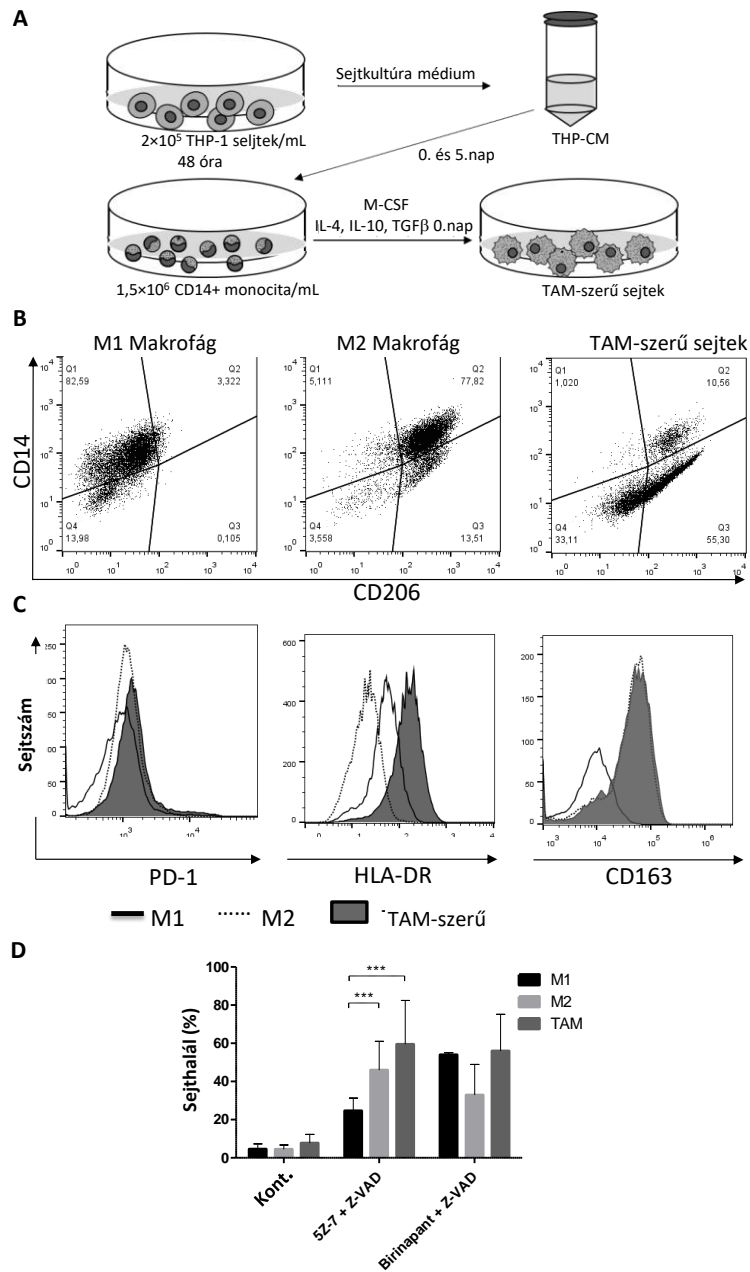
**48. ábra** A TAK1 inhibitor nekroptózist indukál az M2, de nem az M1-sejteken a makrofág-populációk együttes tenyésztésében. (A-D) Az M2 sejteket 10 ng/ml CellTracker™ Green CFDA festékkel töltöttük fel 30 percig. A zölden jelölt M2 és az M1 makrofágokat 1:1 arányban összekevertük, és a sejteket 50  $\mu$ M Z-VAD jelenlétében 0,5  $\mu$ M birinapanttal vagy 1  $\mu$ M 5Z-7-oxozeaenollal kezeltük. (A-B) 24 óra elteltével a teljes sejthalál mértékét a PI felvétele alapján számszerűsítettük. (A) Az ábra öt független kísérletről egy reprezentatív képet mutatja be. (B) A sejthalál százalékos arányát a CellTracker pozitív és CellTracker negatív populációkban számítottuk ki. Az ábrák öt független kísérlet átlagát és SD értékét mutatják. (C-D) A CD80 és CD209 sejtfelszíni expresszióját áramlási citometriával mértük a jelzett kezelések előtt és után 24 órával. Az élő sejteket kapuztuk, és meghatároztuk a CD80 pozitív CD209 negatív (CD80) és CD209 pozitív CD80 negatív (CD209) sejtek százalékos arányát. (C) Az ábra legalább öt független kísérlet átlagát és SD értékét mutatja. (D). Az ábra öt független kísérletről egy reprezentatív képet mutatja be. A B és C ábrákon a statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \* $P < 0,05$ .

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az AURKA és szubsztrátjának a GSK3 $\beta$ -nek az inhibitorait (CCT137690, illetve AR-A014418), amelyek érzékenyítenek a nekroptózisra, hogyan befolyásolják a két sejttípus nekroptotikus folyamatait. Az alkalmazott koncentrációban egyik inhibitor sem okozott nekroptózist, sem az M1, sem az M2 sejteken. TAK1 inhibitorral együtt alkalmazva az M2 makrofágokban az inhibitorok az 5Z-7/Z-VAD indukált nekroptózist sem fokozták, azonban M1 sejteken szignifikánsan növelték az 5Z-7/Z-VAD által kiváltott sejthalál intenzitását. Az AURKA vagy GSK3 $\beta$  útvonalak gátlása ezáltal kiegyenlítettette az M1 és M2 alpopulációk TAK-1 inhibitorral kiváltott nekroptózis érzékenységét. Nec-1 használatával igazoltuk, hogy a sejthalál valóban nekroptózis volt (**49. ábra**). A SMAC mimetikum és Z-VAD stimulus indukált nekroptózist sem az AURKA sem a GSK3 $\beta$  inhibitorok nem változtatták meg, sem M1, sem M2 sejteken (**49. ábra**). Összehasonlítottuk az M1 és M2 alpopulációkban a nekroptózis jelátvitelében szereplő legfontosabb molekulák expresszióját, azonban egyik esetben sem, így az AURKA és GSK3 $\beta$  mennyiségében sem találtunk számottevő különbséget (nem mutatott adat). Eredményeink azt mutatják, hogy az AURKA vagy GSK3 $\beta$  által közvetített túlélési útvonal okozhatja az M1 és M2 eltérő nekroptózis érzékenységét a TAK1-mediált útvonalon, ami azonban nem ezeknek a kinázoknak az expressziós szintjén keresztül szabályozódik.

Ismert, hogy a pro és antiinflammatorikus makrofágok egyensúlyának eltolódása jelentős szerepet játszik a tumorképződésben. Az M2 szerű, tumor asszociált makrofágok (TAM) tumor promótáló, míg az M1 makrofágok inkább tumor ellenes funkciójúak. Terápiás lehetőségként felmerül olyan sejthalál stimulusok használata, amelyek szelektíven a TAM-okra hatnának a tumor mikro környezetben. Ezért megvizsgáltuk, hogy TAK1 inhibitor jelenlétében kiváltott nekroptózis a TAM-ban is képes-e sejthalált kiváltani. TAM-szerű sejteket differenciáltattunk M-CSF, IL-4, IL-10 és TGF $\beta$  valamint THP1 – monocitoid leukémia sejtvonal-felülűszojának jelenlétében és sejtfelszíni markerek alapján jellemeztük azokat. Irodalmi adatoknak megfelelően a kapott TAM-szerű sejtek CD206- és CD163-pozitivitás mellett a CD14-et alacsony szinten expresszálták [138], miközben az MHCII és a PD-1 expressziójuk intenzívebb volt, mint az M1 és M2 makrofágoknak [139],[140] (**50. ábra**). Hasonlóan az M2 sejtekhez a TAM-szerű makrofágok is szenzitívebbek voltak az 5Z-7/Z-VAD indukált nekroptózisra, mint az M1 sejtek, míg a SMAC mimetikum Z-VAD stimulus megközelítően azonos intenzitású sejthalált okozott mindhárom sejtpopulációban (**50. ábra**). Eredményeink alapján a TAM-szerű sejtek sejthalál érzékenysége is inkább az M2 sejtekéhez hasonló, így az 5Z-7/Z-VAD indukált nekroptózis egy potenciális terápiás lehetőség a tumor mikro környezetben a pro/antiinflammatorikus makrofágok egyensúlyának szabályozására.



**49.ábra** Az Aurora Kinase A és a GSK3 $\beta$  inhibitor helyreállítja a TAK1 inhibitor által kiváltott nekroptózis érzékenységet az M1 makrofágokban. (A-D) A makrofágokat 1,25  $\mu$ M CCT137690-nel (AURKA inhibitor) és 10  $\mu$ M AR-A014418 (GSK3 $\beta$  gátló), valamint 38,5  $\mu$ M Necrostatin-1-gyel előkezeltük 1 óra keresztül, majd aktiváltuk (A-B) 1  $\mu$ M oxaenollal 50  $\mu$ M Z-VAD jelenlétében. (C-D) 0,5  $\mu$ M birinapanttal 50  $\mu$ M Z-VAD jelenlétében. 24 óra elteltével a sejthalál mértékét a PI festődés mérésével határoztuk meg. Az ábrák legalább öt független kísérlet átlagát és SD értékét mutatják. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .



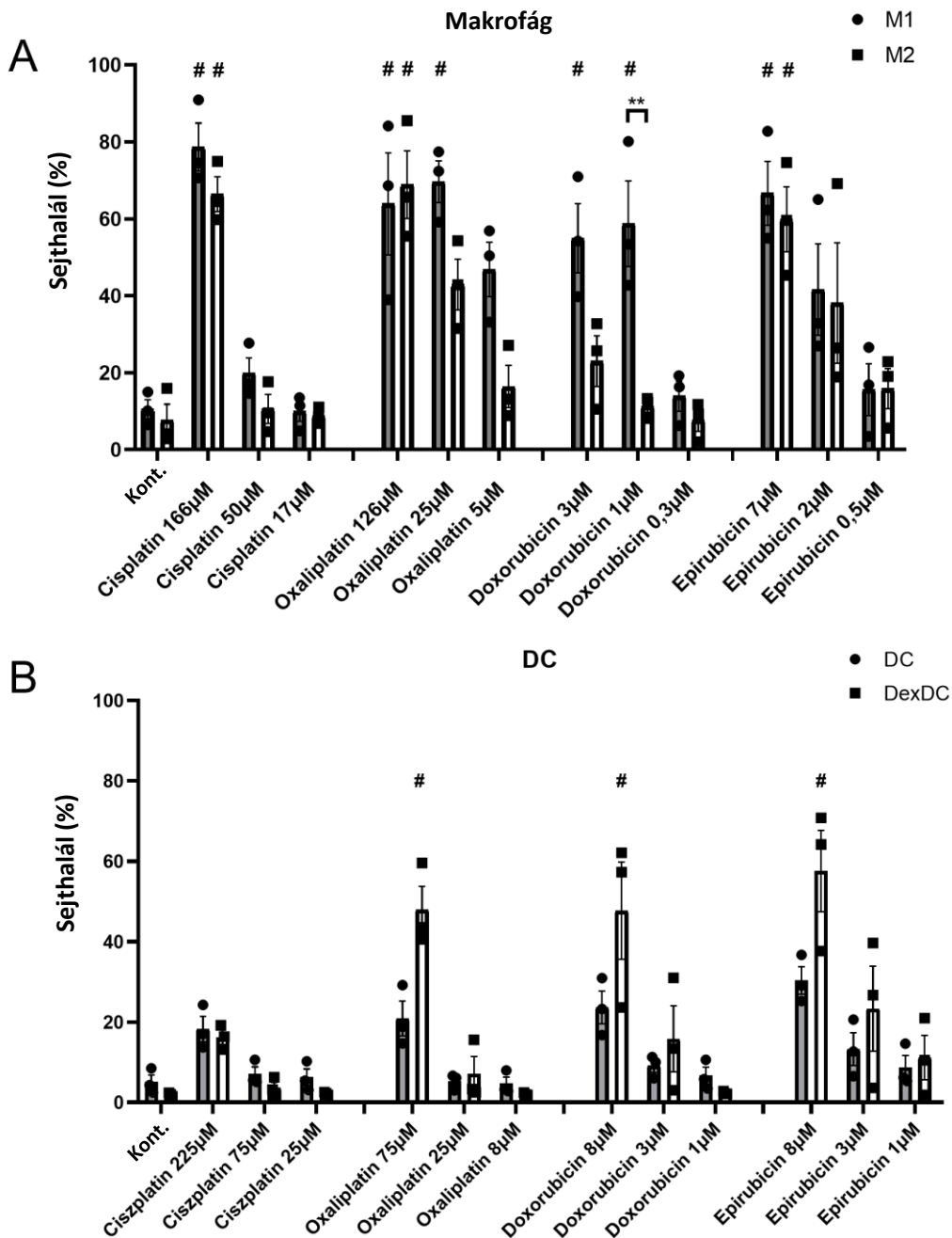
**50. ábra. A TAK1 inhibitor nekroptózist indukál a tumor asszociált makrofágban.** (A) A tumor asszociált makrofág (TAM)-szerű sejtek előállításának vázlatja. A 48 órán át THP-1 sejteken kondicionált tápközeget összegyűjtöttük majd eltávolítottuk belőle a sejteket (THP-CM). A PBMC-ből izolált CD14+ monocitákat M-CSF, IL-4, IL-10 és TGFβ citokineket jelenlétében 5 napig THP-CM-ben differenciáltattuk. Az 5. napon a tápközeget friss THP-CM-re cseréltük. A 6. napon a TAM-szerű sejteket összegyűjtöttük. (B-C) Az in vitro generált TAM-szerű sejteket, valamint M1 és M2 makrofágok CD14 és CD206 vagy CD163, PD-1 és HLA-DR felszíni expresszióját áramlási citometriával jellemeztük. Három független mérésből egy reprezentatív kísérlet eredménye látható. (D) Az in vitro differenciált humán M1, M2 és TAM-szerű sejteket 0,5 μM birinapanttal vagy 1 μM 5Z-7-oxozeaenollal és 50 μM Z-VAD-dal kezeltük. 24 óra múlva a sejtpusztulást PI-festéssel határoztuk meg. Az ábra öt független kísérlet átlagát és SD értékét mutatja. A statisztikai analízishez kétutas ANOVA-t, majd Sidak többszörös tesztjét használtuk. A szignifikancia értéke; \*\*\*P < 0,001.

## 5.9 A platina alapú rákellenes gyógyszerek és antraciklinek immunmoduláló potenciáljának összehasonlítása humán monocita eredetű sejteken [141]

Mivel az M1 és M2 sejtípusok sejthalál érzékenységében különbségeket figyeltünk meg, megvizsgáltunk, hogy jelenleg alkalmazott citotoxikus kezelések hogyan hatnak a két makrofág alpopulációra, illetve a tumor mikrokörnyezetben szintén megtalálható DC-ekre, valamint ennek dexametazonnal tolerogén irányba differenciáltatott (DexDC) változatára. Humán monocitákat *in vitro* 5 napig MCSF jelenlétében tenyésztve makrofágokat nyertünk, majd IFN $\gamma$  és LPS, vagy IL-4, IL-10 és TGF $\beta$  jelenlétében M1, illetve M2 típusú sejté differenciáltattuk azokat. A DC-eket humán monocytoákból differenciáltattunk 5 napig IL-4 és GM-CSF-fel hozzáadásával, dexametazon jelenlétében vagy anélkül. Az így nyert sejteket ciszplatin, oxaliplatin, doxorubicin, illetve epirubicin különböző dózisaival kezeltük. Klinikai alkalmazásban a fenti gyógyszerek maximális plazmakoncentrációja az ajánlott legnagyobb dózisban alkalmazva a 4-16  $\mu$ M tartományba esik [142]. A doxorubicin és epirubicin ebben a koncentrációtartományban is toxikus volt a makrofágok és DC-ek számára. Azonban mind makrofágok, mind DC-k szubpopulációiban nagyon magas ciszplatin és oxaliplatin dózisokra volt szükség sejthalál indukcióhoz, amelyek messze meghaladták a klinikailag elérhető C $_{max}$ -ot.

Az alpopulációk összehasonlításával megállapítottuk, hogy az M1 makrofágok 1  $\mu$ M doxorubicin kezelés hatására szignifikánsan érzékenyebbek a kemoterápia által kiváltott sejthalálra, mint az M2 makrofágok. A másik antraciklin, az epirubicin hozzáadása nem váltott ki intenzívebb sejthalált az M1, mint az M2 makrofágokban (**51. ábra**). A DC-k érzékenyek voltak az oxaliplatin, a doxorubicin és az epirubicin által kiváltott sejthalálra, de mindkét DC alpopuláció rezisztens volt a ciszplatin által kiváltott sejthalálra. A tolerogén DC altípusok jellemzően érzékenyebbek voltak a kemoterápia által kiváltott sejthalálra, mint társaik, de ezek a különbségek az alkalmazott kísérleti körülmények között nem voltak szignifikánsak (**51. ábra**). Eredményeink alapján egyes kemoterápiás szerek a jelenleg alkalmazott dózisokban befolyásolják a tumor környezetbe lokalizált mioeloid sejtek életképességét, és a nagy dózisú kemoterápia alkalmazása alkalmas lehet a tolerogén/immunogén makrofágok és DC szubpopulációk egyensúlyának befolyásolására a tumor mikrokörnyezetében.

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy vajon a kemoterápiás szerek a sejtek életképességének befolyásolása mellett hogyan szabályozzák a makrofágok és DC-ek differenciációját. Ennek tesztelésére a vérből izolált CD14+ monocitákat makrofágokká, illetve DC-kké differenciáltuk M-CSF vagy GM-CSF+IL-4 jelenlétében öt napon keresztül. A kemoterápiás szereket közvetlenül a monociták izolálása után adtuk a sejttenyészetbe, így ezek a gyógyszerek a differenciáció mind az öt napjában jelen voltak a tenyészetben. Ciszplatin és oxaliplatin esetében a kísérleteinkben alkalmazott dózistartomány megfelel a terápiás koncentráció tartománynak. A doxorubicin és epirubicin esetében ezeknek a dózisoknak körülbelül egytizedét használtuk, mivel a magasabb dózisok már toxikusak voltak a monocita differenciálódás során (nem mutatott adat).

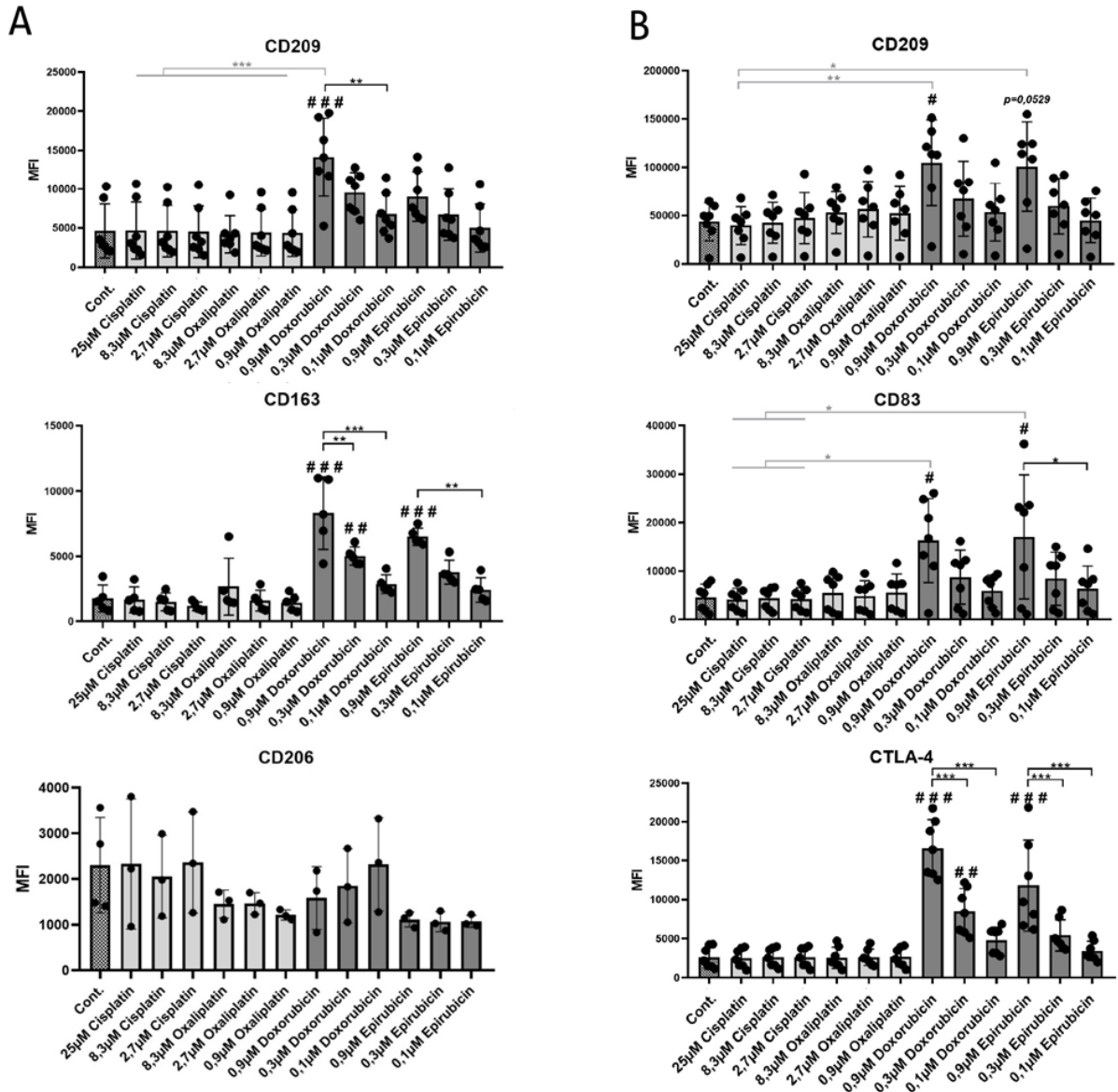


**51. ábra.** A gyulladásszerű és tolerogén makrofágok sejthalálra való érzékenysége különbözik kemoterápiás szerekkel történő kezelésre. (A) A CD14<sup>+</sup> monocitákat 50 ng/ml rekombináns M-CSF-fel tenyésztettük 5 napig, majd a monocita eredetű makrofágokat LPS (50 ng/ml) és IFN $\gamma$  (20 ng/ml), vagy IL-4 (20 ng/ml), IL-10 (20 ng/ml) és TGF $\beta$  (20 ng/ml) jelenlétében M1 és M2 fenotípusú sejtekké differenciáltattuk. (B) CD14<sup>+</sup> monocitákat dendritikus sejtekké differenciáltattunk 100 ng/ml rekombináns IL-4-gyel és 80 ng/ml GM-CSF-fel hozzáadásával, 0,25  $\mu$ M dexametazon jelenlétében vagy anélkül 5 napig. Az *in vitro* differenciált humán M1 és M2 makrofágokat, dendritikus sejteket és dexametazonnal kezelt dendritikus sejteket (DexDC) ciszplatin, oxaliplatin, doxorubicin, vagy epirubicin jelzett dózisaival kezeltük az ötödik napon. 24 óra elteltével a sejthalált PI-festéssel határoztuk meg. Az ábra legalább három független kísérlet átlagát és SD értékét mutatja. A statisztikai elemzésben ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztjét használtuk. A szignifikancia #  $p < 0,05$  volt a kezeletlen kontroll sejtekhez képest, és \*\* $p < 0,01$  az M1 és M2 sejtek között.

Elsőként a sejtfelszíni markerek expresszióját hasonlítottuk össze a négy kemoterápiás szer jelenlétében vagy hiányában differenciálódott makrofágokon és DC-eken. A doxorubicin és epirubicin jelenléte dóziszfüggően növelte az M2 makrofág szubpopulációra jellemző CD209 és CD163 markerek expresszióját, miközben ezek a kezelések nem változtatták meg a CD206 (egy további reprezentatív M2 marker) és nem csökkentették a CD14 (M1 marker) expresszióját (**52. ábra**). DC-eken doxorubicin és epirubicin kezelések után a CD209 C-típusú lektin mannóz receptor, a CD83 érési marker és a CTLA-4 kostimuláló molekula expressziója megnövekedett, míg a CD206, CD80 és PD-L1 markerek expressziójában nem figyeltünk meg változást (**52. ábra, illetve nem mutatott adat**). A ciszplatin és oxaliplatin kezelések a makrofágokon és a DC-ken sem változtatták meg egyik vizsgált molekula expresszióját sem. Eredményeink alapján a doxorubicin és epirubicin jelenlétében a makrofágok és DC-ek differenciálódása megváltozik, ami egyedi, inkább tolerogén markerekkel jellemezhető fenotípusok kialakulását eredményezi.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a kemoterápiás szerek [143] és a makrofágok egyaránt befolyásolják a metasztázisok kialakulását [144]. Ezért megvizsgáltuk az antraciklinek és platina alapú szerek monocita eredetű sejtek kemotaktikus képességére gyakorolt hatását is. Elsőként a kemoterápiás szerek hatását a sejtek migrációs képességére kemokin kezelés nélkül hasonlítottuk össze. (A migrációs aktivitás változását a kezeletlen sejtekhez képest az **53. ábra** x tengelyén történő eltolódása mutatja). Oxaliplatin jelenlétében a makrofágok összességében megnövekedett migrációs potenciált mutattak, míg a ciszplatin nagyobb dózisaival (8,3  $\mu\text{M}$  és 25  $\mu\text{M}$ ) a makrofágok migrációs kapacitásának csökkenését eredményezték. A doxorubicin és epirubicin jelenlétében történő differenciálódás is dóziszfüggően növelte a makrofágok migrációs kapacitását (**53. ábra**). A DC-ek migrációs potenciálja a ciszplatinnal módosított differenciálódás során csökkent, míg az oxaliplatin jelenléte a differenciálódás során dóziszfüggő módon növelte a DC-ek mozgását. A differenciálódás során alkalmazott epirubicin kezelés, ellentétben a doxorubicin alacsonyabb dózisaival (0,1  $\mu\text{M}$  és 0,3  $\mu\text{M}$ ), növelte a DC-k migrációs kapacitását (**53. ábra**).

Ismert, hogy a CCL2 és a CCL5 szabályozza a monociták és makrofágok tumor környezetbe toborzását [145], [146]. Ezért a kemoterápiás szerek hatását a makrofágok és DC-ek migrációs kapacitására CCL2 vagy CCL5 kemokinek jelenlétében is vizsgáltuk. (A kemokin-módosított migrációt az **53. ábra** y-tengelyén történő eltolódása mutatja.) Az oxaliplatin és a nagy dózisu doxorubicin (0,9  $\mu\text{M}$ ) jelenléte a differenciálódás során megnövelte a makrofágok kemotaxisát CCL2 felé (**53. ábra**). A ciszplatin vezérelte differenciálódás a makrofágok mozgását a CCL5 felé csökkentette, miközben a nagyobb dózisu oxaliplatin jelenléte a differenciálódás során növelte azt.



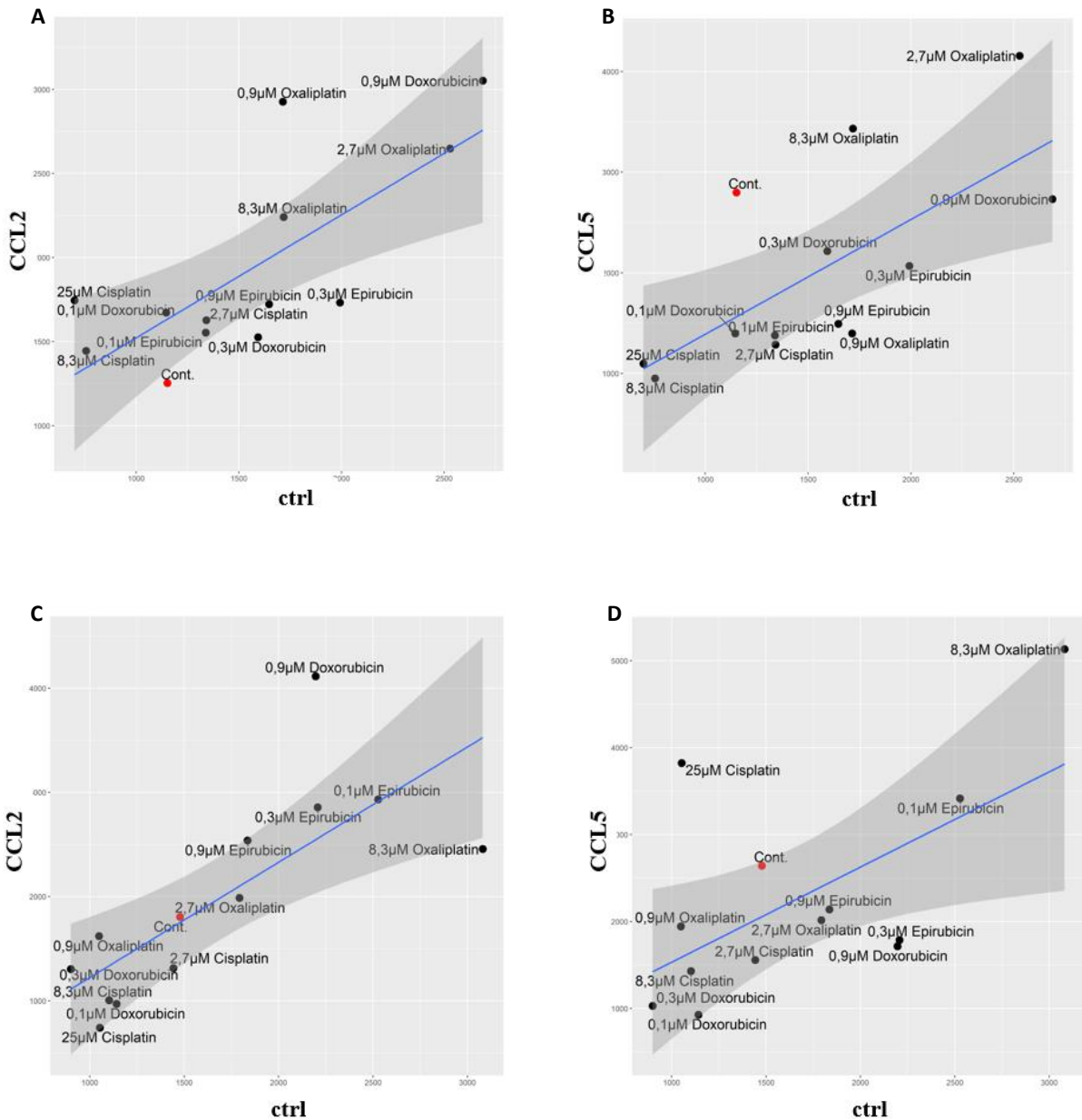
52. ábra. A kemoterápiás szerek jelenléte a differenciálódás során módosítja a sejtfelszíni markerek mintázatát a makrofágokon és a dendritikus sejteken. A CD14<sup>+</sup> monocitákat rekombináns 50 ng/ml rekombináns M-CSF-fel (makrofágok) vagy 100 ng/ml IL-4-gyel és 80 ng/ml GM-CSF-fel (dendritikus sejtek) tenyésztettük. A frissen izolált monocitákhoz ciszplatin, oxaliplatin, doxorubicint, vagy epirubicint adtunk a jelzett dózisokban öt napig. Az ötödik napon mértük a (A) CD209, CD163 és CD206 sejtfelszíni expresszióját makrofágokon, és (B) CD209, CD83 és CTLA-4 expresszióját dendritikus sejteken áramlási citometriával. Az MFI (medián fluoreszcencia intenzitás) átlagértékeit öt független kísérlet +SD alapján számítottuk ki. A statisztikai elemzésben ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztjét használtuk az összehasonlításához. A szignifikancia a kezelt mintával összehasonlítva pedig \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  és \*\*\* $p < 0,001$ , a többi kezelt mintával összehasonlítva pedig \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  és \*\*\* $p < 0,001$ .



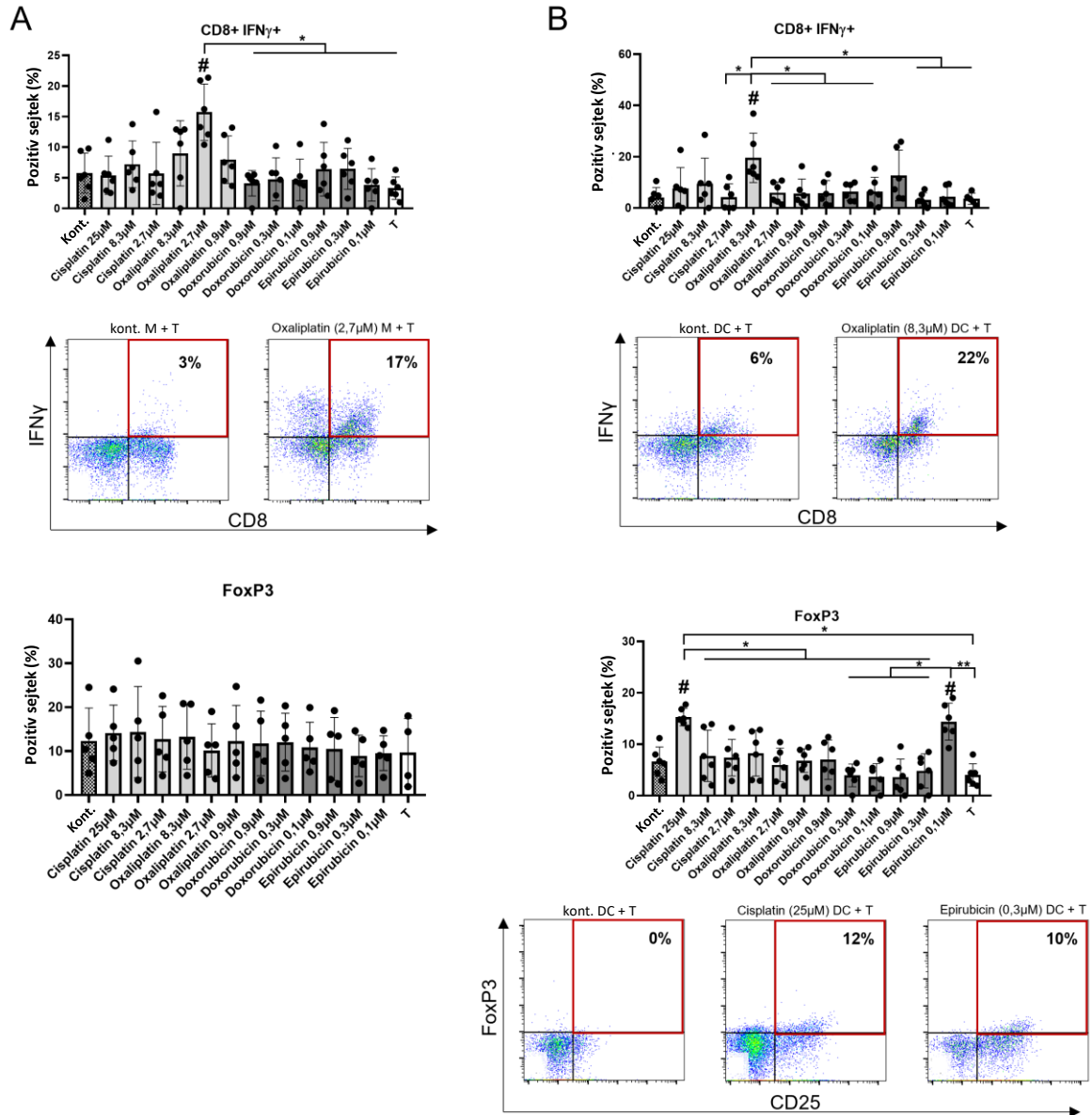
A differenciálódás során alkalmazott epirubicin és doxorubicin kezelés alacsonyabb dózisa csökkentették a makrofágok elmozdulását a CCL5 felé (**53. ábra**). A DC-k migrációs potenciálja csökkent a CCL2 felé a ciszplatinnal módosított differenciálódás eredményeként (**53. ábra**). 25  $\mu\text{M}$  ciszplatin, vagy 8,3  $\mu\text{M}$  oxaliplatin hozzáadása a monocita differenciálódás során növelte a DC-ek mozgásának intenzitását a CCL5 felé. A nagy dózisu doxorubicin (0,9  $\mu\text{M}$ ) jelenléte növelte a DC-ek kemotaxisát a CCL2, de csökkentette a CCL5 felé (**53. ábra**). Ezzel szemben az epirubicin-modulált differenciálódás nem változtatta meg a DC-ek mozgását sem CCL2 sem CCL5 irányába (**53. ábra**). Összességében, a különböző kemoterápiás gyógyszerek jelenléte a monociták differenciálódása során módosította a makrofágok és DC-k migrációs potenciálját és kemotaxisát a CCL2 és CCL5 felé, jelentős egyedi eltéréseket mutatva az egyes szerek hatásai között.

Vizsgáltuk a kemoterápiás szerek hatását a makrofágok és DC-ek kemokin és citokin termelésére is. Megállapítottuk, hogy az oxaliplatin magas koncentrációja (8,3  $\mu\text{M}$ ) szignifikánsan növelte a makrofágok IP-10 kemokin szekrécióját, míg a másik platina alapú szer, a ciszplatin kezelés hatástalannak bizonyult. A makrofágokhoz hasonlóan 8,3  $\mu\text{M}$  oxaliplatin kezelés növelte a DC-ek IP-10 termelését is. A makrofágok és DC-ek citokin termelését vizsgálva nem tudtunk különbséget kimutatni az  $\text{IFN}\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 TNF $\alpha$  vagy IL-12 termelésében a kezeletlen és a kemoterápiás gyógyszerek jelenlétében differenciált sejtek között (nem mutatott adatok).

Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a kemoterápiás szerekkel kondicionált makrofágok és DC-ek befolyásolják-e a T-sejt válasz polarizációjának az irányát. A kemoterápiás szerek jelenlétében differenciált makrofágokat vagy DC-eket T-sejtekkel együtt tenyésztettünk, és az így differenciálódó T-sejt alpopulációk jellemzésére, a CD4 és CD8 markerek mellett, a CD25 expresszióját, a FoxP3 és az IL-10 intracelluláris szintjét detektáltuk, mint regulátor T-sejtek markereit, valamint az  $\text{IFN}\gamma$ , IL-4, IL-17 és intracelluláris expresszióját ellenőriztük, mint a Th1, Th2 és Th17 és sejtek jellemző markereit. A monocita differenciálódása során alkalmazott oxaliplatin kezelés meghatározott dózisa a kifejlődött DC-ek és a makrofágok jelenlétében kialakuló T sejtek fenotípusát megváltoztatta, az INF gamma-pozitív citotoxikus T-sejtek arányának növekedését eredményezve (**54. ábra**). Ezzel ellentétesen, a FoxP3-pozitív T-sejtek arányának növekedését figyeltük meg a T-sejteket nagy dózisu ciszplatin vagy alacsony dózisu epirubicin jelenlétében differenciált DC-ekkel együtt tenyésztve (**54. ábra**). A monocita eredetű makrofágok vagy DC-ek differenciálódása során alkalmazott kemoterápiás szerek jelenléte nem módosította az ezen mioeloid sejtekkel együtt tenyésztett T-sejtek IL-4- és IL-17-termelő altípusokká történő polarizációját (nem mutatott adatok). Eredményeink alapján a két platinaalapú szer monocita differenciálódásra gyakorolt hatása szignifikánsan különbözik a képződött DC-ek T-sejt polarizációs képességét tekintve; az oxaliplatin a citotoxikus T-sejtek szintjét, míg a ciszplatin a szabályozó T-sejtek számát növelte.



**53. ábra.** A kemoterápiás szerek jelenléte a differenciálódás során módosítja a makrofágok és dendritikus sejtek kemotaktikus képességét. *A* CD14<sup>+</sup> monocitákat 50 ng/ml rekombináns M-CSF-fel (makrofágok) vagy 100 ng/ml IL-4-gyel és 80 ng/ml GM-CSF-fel (dendritikus sejtek) tenyésztettük ciszplatin, oxaliplatin, doxorubicin, vagy epirubicin jelenlétében öt napig. Az ötödik napon a makrofágok és a dendritikus sejtek migrációs intenzitását sejtszám szerint határoztuk meg féligáteresztő membrán inszert segítségével. A szórásdiagramok kontroll és kemoterápiás kezeléssel kondicionált (*A* és *B*) makrofágok és (*C* és *D*) dendritikus sejtek mozgékonyágát mutatják, (*A* és *C*) 10 ng/ml CCL2, vagy (*B* és *D*) 3 ng/ml CCL5 kezelést követően. Az X-tengelyen történő elmozdulás a különbözőképpen differenciált sejtek migrációs képességét mutatja kemokin kezelés nélkül, míg az Y tengelyen történő elmozdulás a CCL2 vagy CCL5 irányába történő mozgást mutatják. A migrált sejtek számát három független kísérlet átlagából határoztuk meg. A szóródási diagramok R stúdió platformon (GGplot2) készültek.



**54. ábra.** A kemoterápiás szerek jelenlétében történt differenciálódás megváltoztatja a makrofágok és a dendritikus sejtek T-sejtek polarizációs képességét. A CD14+ monocitákat 50 ng/ml rekombináns M-CSF-fel (makrofágok) vagy 100 ng/ml IL-4-gyel és 80 ng/ml GM-CSF-fel (dendritikus sejtek) tenyésztjük ciszplatin, oxaliplatin, doxorubicin, vagy epirubicin jelenlétében öt napig. Az ötödik napon a makrofágokat vagy a dendritikus sejteket allogén perifériás vér limfocitáival (PBL) együtt tenyésztünk 1:10 monocita eredetű sejt:T-sejt arány mellett 37 °C-on. Három (CD8+ Tc) vagy kilenc nap (CD4+ Treg) elteltével a T sejteket 1  $\mu$ g/ml ionomicinnel és 20 ng/ml phorbol-mirisztát acetáttal (PMA) stimuláltuk 4 órán keresztül, vezikuláris transzport gátló jelenlétében. Az IFN $\gamma$ -t termelő citotoxikus T-sejtek és a CD4+ regulátor T-limfociták (CD25+ IL-10+) arányát a PBL sejtek kontroll vagy kemoterápiás kezeléssel kondicionált (A) makrofágokkal vagy (B) dendritikus sejtekkel történő együttes tenyésztése után detektáltuk. A „T” minta azt jelzi, hogy a kontroll csak T-sejtekből áll, monocita eredetű sejtek nélkül. A sejtarányokat legalább öt független kísérlet +SD alapján számítottuk ki, valamint a szignifikáns különbségeket mutató minták egy-egy reprezentatív pontdiagramja látható az 5-5 kísérletből. A statisztikai elemzésben ANOVA-t, majd Bonferroni post hoc tesztjét használtuk az összehasonlításhoz. A szignifikancia értéke #p < 0,05 a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva, és \*p < 0,05 a többi kemoterápiás szerrel kezelt mintákhoz sejtekhez képest.

## 6 DISZKUSSZIÓ

Kutatómunkánk során a sejthalál és az immunrendszer interakcióit vizsgáltuk. Az immunrendszer és a sejthalál folyamatok szabályozási folyamatai több helyen kapcsolódnak. Egyrészt az immunválasz citotoxikus működése sejthalált indukál emberi sejtekben. Másrészt az immunrendszer sejtjei is sejthalál folyamatokon mennek keresztül. Ráadásul egyes esetekben az immunválasz citotoxikus működése vezet az immunsejtek pusztulásához, azaz a két aspektus egyszerre érvényesül. Továbbá a sejthalál folyamatok is meghatározhatják az immunválasz aktivitását, irányát.

A fenti folyamatokat kilenc alpontra osztjuk, majd saját eredményeinket e szerint diszkutáljuk:

(1) Az immunválasz során bármely magvas sejtünk elpusztulhat, hiszen az intracelluláris kórokozók jelenléte, vagy a tumoros elváltozások egyaránt aktiválják az immunrendszer citotoxikus működését és ilyenkor szabályozott, az immunrendszer által ellenőrzött folyamatban eliminálódnak a veszélyes emberi sejtek.

Az immunrendszer sejtjeinek halálához (2) programozott, (3) szabályozatlan és (4-6) szabályozott folyamatok vezethetnek. (2) A **programozott** sejthalál folyamatokkal, a sejtek féléletidejét meghatározó lépésekkel a kutatásainkban részletesen nem foglalkoztunk. Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy különböző túlélő szignálok (növekedési faktorok, citokinek, integrinek, sejt-sejt kapcsolatok) jelenléte, hozzáférhetősége jelentősen módosíthatja az egyes sejtek életidejét. Az immunrendszer sejtjei esetében ezek a szabályozási lehetőségek valószínűleg nagyobb jelentőségűek, mint a stabil szöveti környezetben elhelyezkedő egyéb sejt típusoknál.

Az immunrendszer sejtjei elpusztulhatnak a kórokozók, tumorok elleni küzdelemben, részben szabályozott (például a neutrofil granulociták netózisa, apoptózisa), (3) részben nem tervezett folyamatként, járulékos veszteségként (például a citotoxikus T sejtek, NK sejtek sejthalála). Ezeket a **szabályozatlan** eseményeket a dolgozatban szintén nem vizsgáltuk.

Az immunrendszer sejtjeinek **szabályozott** sejthalálát több fázisra oszthatjuk. (4) A limfociták fejlődésekor az elsődleges immunszervekben lezajló negatív és pozitív szelekciós lépések során az önveszélyes és működésképtelen klónok eliminálódnak. (5) A perifériás immunreakciók során is zajlik szelekció, az antigén megjelenését követően kiválasztódnak az antigén specifikus B sejtek, ami a legnagyobb affinitású klónok proliferációját és ugyanakkor a kisebb affinitású sejtek sejthalálát indukálja. (6) Az immunválaszt követően a feleslegessé váló az eliminált antigénre specifikus limfociták, az aktiváció indukált sejthalál során halnak el.

A sejthalál és az immunrendszer interakcióját vizsgálhatjuk abból a szempontból is, hogy a sejthalál folyamatok hogyan modulálják az immunválaszt. (7) A sejthalál során esetlegesen felszabaduló mediátorok (DAMP-ok és RAMP-ok) aktiválhatják a természetes immunrendszert, vagy szövetregenerációs folyamatokat indíthatnak el. (8) Az immunogén sejthalál a naiv T limfociták, azaz az adaptív immunrendszer aktivációját segíti. (9) Végül az immunrendszer sejtjeinek akár szabályozott,

akár szabályozatlan elhalása módosíthatja az egyes sejttípusok arányát egy adott szöveti környezetben, befolyásolva ezzel az immunológiai egyensúlyt.

Kutatásaink során ennek a komplex rendszernek összefüggéseit vizsgáltuk (a 2-3-as pontok kivételével).

(1) Immunológiai szempontból a sejthalál legfontosabb feladata a veszélyessé váló sejtek eliminálása, a tumor sejtek és az intracelluláris kórokozó elpusztítása, a patogén lehetséges életterének szűkítése. A kórokozók érzékeléséért a természetes immunrendszerben a mintázatfelismerő receptorok a felelősek elsősorban. Több mintázatfelismerő receptorról is ismert, hogy sejthalált is okozhatnak az általános gyulladási és/vagy anti-virális mechanizmusok aktiválása mellett. A TLR3 és TLR4 receptorok apoptózist és nekroptózist, a NOD like receptorok piroptózist, az intracelluláris RNS-t, DNS-t érzékelő receptorok (RIG, ZBP1) apoptózist, nekroptózist, piroptózist, panoptózist egyaránt indukálhatnak [147].

A fertőzött vagy tumoros sejteket felismerő citotoxikus sejtek (NK és CTL) szolubilis mediátorokkal és a sejtfelszíni sejthalál receptorokat stimulálva ölik meg a célsejteket. A két sejthalál folyamatot aktiváló receptorcsalád, a mintázat és a sejthalál receptorok együttműködését meglepően keveset vizsgálták.

Saját vizsgálataink két meglepő eredményt hoztak. Egyrészt, a TLR5 (de a többi TLR receptor nem) együttes stimulálása a sejthalál receptorokkal fokozta a sejthalált. Másrészt, a TLR5 fokozó hatása elsősorban RIPK1-mediált folyamatok aktivációján keresztül érvényesült. A TLR5 liganduma a flagellin egyedi tulajdonsága, hogy fehérje típusú PAMP. A flagellin így antigénként is T sejt aktivációt okozhat és ismert, hogy intenzív ellenanyagtermelés is kialakul a flagellin ellen [148]. Ezek a tulajdonságai alkalmassá teszik a flagellint a természetes és az adaptív immunrendszer egyidejű aktiválására. A RIPK1-indukált sejthalálról ismert, hogy elősegíti az immunogén sejthalál kialakulását, így segíti a keresztprezentációt, a naiv T sejtek aktivációját. Fenti eredményeink szerint a TLR5 ideális adjuváns lehetne, mivel több lépcsőben is elősegíti DC-k és a naiv T sejtek aktivációját. Ezzel összhangban számos megközelítésben vizsgálják a flagellint, mint potenciális adjuvánt a rák immunterápiájában, ahol a flagellin tumorantigénnel történő együttes adása segítette a tumorelleses immunitást [149].

(4) Az antigén specifikus receptorok jelátvitelének egyik legérdekesebb kérdése, hogy hogyan szabályozódik a jelátvitel átkapcsolása; a BCR és TCR receptorok a negatív szelekció során sejthalál szignálokat közvetítenek, de ugyanezen receptorok stimulálása a specifikus klónok aktivációját, proliferációját indukálja a perifériás immunválaszban. A tranziens B sejtek a csontvelőből már kikerült, de még éretlen B sejt-ként viselkedő sejt-populáció, amelyek a másodlagos immunszervekben –egyebek mellett az itt termelődő BAFF hatására– alakulnak érett B sejt-ké. Kimutattuk, hogy a tranziens (éretlen) és érett B sejtek jelátvitelénél a Gab1/2 adapter fehérjék által összetartott molekula komplexek eltérőek, különös tekintettel az Erk fehérjék asszociációjára. A Gab adapter fehérjékhez az érett sejtekben több tirozinon foszforilált molekula kötődik, és ennek megfelelően érett B sejtekben

fokozódott a Gab1/2-Erk asszociáció és az Erk1/2 foszforiláció. Kimutattuk, hogy a Gab2 segíti a PI3K membrán lokalizációját és ezen keresztül a BCR indukált túlélő jelek kialakulását [124].

A sejthalál és túlélőjelek átkapcsolásának kérdése a szakirodalomban továbbra semsem tisztázott. A limfociták fejlődése során az antigén receptor láncok szomatikus rekombinációja, a működőképes receptor kialakulása nem minden esetben sikeres. Az egyes láncok átrendeződését mindig ellenőrző lépés követi, ahol a lánc hiánya apoptózishoz vagy új átrendeződéshez vezet. A sikeresen átrendezett nehéz (B sejt) vagy  $\beta$  (T sejt) láncok, illetve a könnyű vagy  $\alpha$  láncok átrendeződését követően a BCR és TCR sejtfelszíni megjelenése ligand független szignalizációt eredményez, ami egyszerűen a lánc/receptor sikeres expresszióját bizonyítja [150]. A sikeres átrendeződést követi a negatív szelekció, ahol a specifikus antigén (elsődleges immunszervekben ez csak autoantigén lehet) megkötése az autoreaktív sejt apoptózisához, esetleg újabb átrendeződési lépésekhez vezet. Újabb eredmények szerint, az autoantigének felismerése a BCR internalizációját eredményezi, így a BCR-mediált jel erősség csökkenése - különös tekintettel a PI3K szignál gyengülése- vezethet apoptotikus, vagy újabb átrendezési lépésekhez [151]. Emellett más munkacsoportok is megerősítették eredményeinket, hogy az ERK szignalingban kialakuló különbségek lehetnek döntőek, egyebek mellett a BCR internalizációt is szabályozva [152], [153].

(5) Míg a mitokondriális apoptózis a sejtek féléletidejét az őket ért pozitív és stressz hatások összességében szabályozza, a sejthalál receptorok az immunrendszer számára biztosítják a sejtek élettartamának ellenőrzését. Az úgynevezett II-es típusú sejtekben a sejthalál receptor indukált folyamatok a Bid proapoptotikus fehérje hasításán keresztül a mitokondriális apoptózist is aktiválva vezetnek a sejt pusztulásához [24]. Ilyenkor a túlélő és stressz jelek, a BCL-2 család anti és proapoptotikus tagjainak mennyisége, a sejt „fitnesze” befolyásolhatja az immunrendszer felől érkező sejthalál szignálokat. Ez a rendszer lehetőséget ad a túlélőjelek jelenlétének, intenzitásának figyelembevételére. A túlélő jelek és az extrinszik sejthalál szignálok egyensúlyának mérése ideális rendszer lehet a szelekciós folyamatokban, amikor az intenzívebb túlélő jelet kapó (pl antigénspecifikus) sejtek kiválogatása történik.

Az immunválasz során legintenzívebben vizsgált szelekciós folyamat az antigén specifikus B sejtek kiválasztása, affinitás érése. A szelekció során az egyes sejtek versengenek az antigénért és az antigén felismerő klónok közül csak a legnagyobb affinitású sejtek lépnek tovább a folyamatban, az erősebb túlélő szignálok hatására. Az antigént felismerő, az azt megkötni, internalizálni és prezentálni képes sejtek a T sejtekkel interakcióba kerülnek, aminek következtében kialakulhat a FasL-Fas kapcsolat. Az antigén specifikus sejtek túlélését elsősorban a B sejt receptoron keresztül érkező stimulusok biztosítják, de emellett a folliculáris dendritikus sejteken és a folliculáris helper T sejteken megjelenő receptorok (CD40, ICOS), a termelt citokinek (IL4, IL21) is elősegítik az antigénnel szoros kapcsolatba kerülő B sejtek életben maradását [50].

Kutatásaink során B sejtekben az antigén specifikus és nem specifikus túlélőjelek együttműködését vizsgáltuk a Fas-indukált apoptózisra. Eredményeink szerint a BCR-mediált túlélő szignál, valamint a TLR9 és BAFF közvetített túlélő jelek additívnak bizonyultak. A TLR9 és a BAFFR antigén specificitástól függetlenül megtalálható a B sejteken, így az ezeken keresztül érkező szignálok a nem specifikus, esetleg autoreaktív B sejtek túlélését is segíthetik. A BAFF túlzott expressziója ennek megfelelően B sejt hiperpláziát és autoimmun rendellenességeket okoz így például szisztémás lupus erythematosus-ban és rheumatoid arthritis-ban is megnövekszik a BAFF koncentrációja [154]. Kimutatták ugyanakkor, hogy a BCR-ligáció fokozza a BAFF-R kifejeződését, így a BAFF szignál is jobban érvényesülhet az antigén specifikus sejteken [155]. A TLR9 és a BCR együttes aktiválása elősegíti az autoantigén-specifikus B-sejt választ [72], ami különösen kritikus szerepet játszik a DNS-t felismerő autoreaktív B sejt klónok aktiválásban és így a nukleáris antigének elleni autoimmun reakciók kifejlődésben [73].

Az immunválasz korai szakaszában több B sejtre lehet szükség, ilyenkor az alacsonyabb specificitású B sejtek is túlélhetnek – nagyobb antigén koncentráció intenzívebb BCR szignált eredményez -, míg az immunválasz késő szakaszában (csökkenő antigén mennyiség) már csak az egyre nagyobb affinitású sejtek életben maradása, memória sejté differenciálódása a folyamat célja. A sejthalál és túlélő jelek egyensúlya ezért sokrétűen szabályozott, többek között a természetes immunrendszer felismerő mechanizmusai is befolyásolhatják a germinális centrumban zajló szelekciós folyamatok küszöbértékét. A korokozó jelenléte a B sejteken található PRR-eket, valamint a természetes immunrendszer sejtjeit is aktiválhatja. Ebben az esetben a B sejteken található TLR9 is túlélő jeleket közvetíthet és a BAFF, amelyet főként mieloid sejtek termelnek, is nagyobb mennyiségben lehet jelen. Kórokozó hiányában azonban feltételezhetően a nem antigén specifikus jelek csökkennek, így a BCR szerepe egyre hangsúlyosabbá válik.

A sejthalál és túlélőjelek egyensúlyának szempontjából is fontos kérdés, hogy az alapvetően irreverzibilis lépésekre, fehérje hasításokra épülő apoptotikus jelátvitelt, milyen mechanizmusok finomszabályozzák. A mitokondriális apoptózis kezdeti lépései sokrétűen kontrolláltak. A pro és antiapoptotikus tagok expressziója, lebontása, poszttranszlációs módosításai, és a tagok összehangolt működése is pontosan szabályozott folyamat. A kaspázok aktivációját is jelentősen módosítják poszttranszlációs módosulások, lebontásuk sebessége és az IAP fehérje család is [156].

Az extrinszik apoptózisban a sejthalált kialakító jelátviteli lépésekről egyre több adat áll rendelkezésre, az ezt gátló mechanizmusok pontos működése azonban kevésbé ismert, különösen a jelátviteli kezdeti szakaszán. A sejthalál receptorok mennyisége viszonylag állandó, de a ligandumaik expressziója erősen korlátozott [20]. A receptorok „érzékenységét”, aktivációs küszöbét több tényező befolyásolja. Csalétek receptorokkal ez a receptor-ligand arány befolyásolható, a receptorok raft lokalizációja, citoszkeletonhoz csatlakozása, endocitózisának sebessége, palmitoilációja, foszforilációja egyaránt módosíthatja a sejthalál szignálok intenzitását [157].

A B sejtek aktivációjának-gátlásának, az ITAM-ITIM mediált jelpályák egyensúlyának szabályozásának kulcsszereplője az SHP1 foszfatáz. A 2002-ben megvédett PhD disszertációmban ennek az egyensúlynak vizsgálatával foglalkoztam. Későbbi kutatásainkban felmerült annak a lehetősége, hogy az SHP1 a sejthalál szabályozásában is szerepet játszik, mivel publikálták Fas-hoz kötődését [118].

Kimutattuk, hogy A20 B sejtvonalon az SHP1 hiánya fokozta a Fas-indukált apoptózist. A Fas asszociált SHP1 a VAV adapter fehérje defoszforilációjával gátolja a Fas-ezrin és ezen keresztül a Fas-aktin kapcsolatot, ami csökkenti a Fas endocitózisának mértékét és így az apoptózis intenzitását. Eredményeink egyrészt egy új, reverzibilis szabályozási lépést írtak le a sejthalál receptor indukált apoptózis során, másrészt az immunológiai folyamatok szabályozásában jólismert SHP1 foszfatáz szerepét egy új jelpályában is bemutattuk. Érdekes összevetés, hogy a citoszkeleton átrendeződés SHP1-VAV kapcsolaton keresztüli kontrollálását leírták az NK sejtek citotoxikus funkcióinak negatív szabályozójaként is [119]. Így ez a molekuláris mechanizmus egyidejűleg, mind a citotoxikus, mind a target sejtekben hathat a sejt-sejt interakciós területen kétoldalúan szabályozva a kialakuló sejthalál jel intenzitását.

(6) Az immunválasz során a Fas-indukált apoptózis szerepet játszik a fertőzött sejtek, tumorok elpusztításban, de nélkülözhetetlen az autoreaktív T és B sejtek eltávolításában is, ezáltal a Fas-indukált sejthalál megismerése az immunológiai tolerancia szabályozásának új lehetőségét is 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 [29],[30].

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 [158],[159]. A sejthalál ligandumok sejtfelszíni megjelenését követően sejt-sejt kontaktus útján is előidézhetik a sejthalált, de az ultracentrifugálással nyerhető szekretált vezikulumok felszínén is kimutattak FasL, TRAIL és TNF expressziót. A sejtfelszíni és a vezikula kötött FasL a Fas receptorok oligomerizációját váltja ki és ezen keresztül képes apoptózist előidézni. Ezzel szemben a szolubilis FasL monomer formája elsősorban a sejthalál kompetitív inhibitora, mivel gátolja a receptor aggregációját. Sem a FasL gátlásával sem apoptózis inhibitorokkal nem lehet teljes mértékben megakadályozni az AICD-t, ami arra utal, hogy a Fas függő apoptotikus jelpályák mellett, eddig nem pontosan ismert Fas független és nem apoptotikus sejthalál mechanizmusok is részt vesznek az AICD mechanizmusában [159].

Eredményeink szerint Fas receptor hiányában az aktivált T sejtek felülűszója nem apoptotikus sejthalált indukál, kompenzálva az apoptotikus jelpályák funkcióvesztését. A Fas receptor expressziója



így elsősorban nem a sejthalál intenzitását befolyásolja, hanem annak immunológiai kimenetét, hogy a nagyszámú elhaló T sejt Fas-mediált apoptózisa ne váltson ki immunológiai reakciókat.

Kutatásaink érdekes aspektusa, hogy a citotoxikus T sejtek által szekretált vezikulumon expresszáldó FasL eltérő Fas-mediált apoptózist indukál, mint a rekombináns, vagy a sejtfelszíni FasL. A vezikulumokon/ban tárolt FasL a vezikulumok további, ismeretlen komponenseivel együtt hat a target sejtekre. A komplex hatások eredményeként egy Fas és RIPK1 függő apoptózis alakul ki, szemben a RIPK1 független apoptózissal, ami rekombináns FasL, vagy sejtfelszíni FasL stimulus következtében jelenik meg. Kimutattuk, hogy eltérő eredetű T sejtek (PBMC/Jurkat sejtvonal) felülűszoja eltérő apoptotikus jelpályákat aktivált a target sejtekben. Ezek alapján feltételezhető, hogy a citotoxikus vezikulumok összetétele nem állandó, ami az immunválasz egyes fázisaiban befolyásolhatja fertőzött, vagy tumor sejtek elpusztításának pontos mechanizmusát, de a T sejtek AICD folyamatait is.

(7) Az elmúlt évtizedekben számos sejthalál formát írtak le. 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 folyamatok immunológiai kimenete ráadásul nem csak a természetes immunrendszer szempontjából lehet eltérő, anti- illetve proinflammatorikus, hanem az adaptív immunrendszer szempontjából is, tolerogén vagy immunogén immunválaszt eredményezve [113]. Több esetben ismert, hogy az egyes jelátviteli utak sérülése, kiesése egy másik, a sejt elhalását okozó jelátviteli utat aktivál, mivel az egyes sejthalál folyamatok jelpályái jellemzően több ponton keresztezik egymást [160]. Amennyiben a sejthalál az optimális útvonalról bármely okból, (genetikai eltérések, fertőző ágensek, a tumorok sejthalál elkerülése, addicionális szignálok hatására) egy másik sejthalál formára kapcsol át, az megváltoztatja a folyamat immunológiai kimenetét. A sejthalál ilyen diszregulációja (amikor az elhaló sejtek száma normális, de a folyamat az optimális útvonalon történik) következik be számos, jellemzően autoinflammatorikus és degeneratív betegség patomechanizmusában.

A különböző sejthalál folyamatok átkapcsolását szabályozó molekuláris programok nem minden esetben, illetve nem pontosan ismertek. Ésszerű feltételezni, hogy az egyes jelpályák közös molekulái szabályozhatják az átmenetet az egyik sejthalál útról a másikra. Ebből a szempontból fontosak eredményeink, melyekben kimutattuk, hogy nem alakul ki nekroptózis a kaszpáz-9 hiányos sejtvonalakban. A kaszpáz-9-et, mint a mitokondriális apoptotikus útvonal iniciátor kaszpázát írták le, azonban szerepe a nekroptózisban egyáltalán nem volt ismert. Feltételezzük, hogy a kaszpáz-9, amely a mitokondriális apoptózis kulcsmolekulája és emellett szerepet játszik a nekroptózisban is, szabályozza az apoptózis nekroptózis átmenetet, és így vonzó célpontot jelenthet a farmakológiai beavatkozásokhoz a sejthalál diszregulációja esetén.

A sejthalál receptor-mediált apoptózis és a nekroptózis interakciója intenzíven vizsgált. Az apoptotikus útvonalon aktiváldó kaszpáz-8 hasítja a RIPK1, RIPK3 molekulákat, gátolva a nekroptózist és egyúttal biztosítva a tolerogén sejthalál dominanciáját a gyulladással járó folyamattal szemben. A

nekroptózis túlműködése különböző neurodegeneratív kórképekben és gyulladásos megbetegedésekben kimutatott emberben is és számos knock out állatmodellben is [34]. A túlzott nekroptózis akár halálozáshoz is vezethet. A sejthalál receptor mediált apoptózis működésének blokkolása például a FADD, vagy a kaszpáz-8 KO állatokban embrionális letalitást okoz. RIPK3 vagy MLKL hiányában (kaspáz-8/RIPK3, vagy FADD/MLKL dupla KO állatokban) ez a korai halálozás megszűnik, bizonyítva a nekroptózis túlműködésének szerepét a letalitáshoz vezető folyamatban [49]. Fontos megjegyezni, hogy kísérletes körülmények között a nekroptózis indukciója leggyakrabban pankaspáz inhibitor jelenlétében történik. *In vitro* kísérleteink során ennek megfelelően a kaszpáz-9 proteáz aktivitása gátolt volt, így nekroptotikus szabályozó szerepét feltehetően, mint adaptor fehérje tölti be.

További gyulladásos kórképek mellett a nekroptózis szerepét pankreatitiszben is kimutatták. *In vivo* állatmodellekben a RIPK3 vagy az MLKL hiánya gátolta a cerulein indukált pankreatitist [134], [135]. *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 AURKA konstitutívan RIPK1-hez és RIPK3-hoz kapcsolódik és így gátolja a spontán nekroptózis kialakulását [46]. Csendesítése vagy gátlása hatására az AURKA leválik a RIP kinázokról, ezáltal lehetővé válik a RIPK1-RIPK3, valamint a RIPK3-MLKL asszociáció és nekroptózis váltható ki PDAC (pankréás karcinóma) sejteken. Saját eredményeink szerint a kaszpáz-9 hiányos Jurkat sejteken is a vad típusú sejtekkel azonos intenzitású nekroptózis indukálható az AURKA gátló szuboptimális (önmagában nem toxikus) koncentrációban történő használata mellett. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a kaszpáz-9 nem feltétlen szükséges a nekroptózishoz, szenitizált sejteken annak hiányában is végbe mehet a folyamat. Hasonló eredményeket kaptunk RIPK1 vagy RIPK3 overexpressziót követően is. Mindkét overexpresszált sejtben kaszpáz-9 hiányában is indukálható nekroptózis.

Kaspáz-9 hiányos makrofág és endotél sejteket vizsgálva nem kaptunk különbséget a vad típusú és a deficiens sejt párok között (nem mutatott adat). Összességében eredményeink szerint a kaszpáz-9 nem feltétlen szükséges a nekroptózishoz, szerepe sejtípustól és a sejt állapotától is függ, de bizonyos sejtekben (T sejt, fibroblaszt, acinus sejt) részt vesz a nekroptózis finomszabályozásában.

(8) A denritikus sejtekről (DC) ismert, hogy folyamatosan fagocitálják a pusztult sejteket, és ezt követően képesek a fertőzött, vagy tumorsejtekből származó antigén fragmenteket keresztprezentációval MHC I-en keresztül is bemutatni, ezáltal lehetővé válik a naiv CTL sejtek aktiválása [98]. Mivel élő humán sejtek fagocitózisa, néhány speciális esettől [161] eltekintve nem történik meg, az intracelluláris antigének a sejtek pusztulását követően kerülhetnek át a DC-kbe. Ezért a sejthalál a naiv T sejt aktiváció folyamatának limitáló és lassító tényezője lehet. Ismert, hogy a

sejthalál modalitása is meghatározó, nem minden sejthalál útvonal eredményez hatékony fagocitózist, DC aktivációt és migrációt, vagy keresztprezentációt [98].

Eredményeink szerint az éretlen, szövetekben lokalizált DC-k PRR aktivációt követően citotoxikussá válnak, felülűszójuk képes sejthalált indukálni. Ez a folyamat nagyban segítheti az antigén átterülését 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 [112]. Ezek alapján valószínűsíthetjük, hogy a DC-k citotoxikus reakciói felgyorsítják a naiv T sejt aktivációt. Ez a megfigyelésünk egyben egy újabb érdekes aspektusa PRR-DR együttműködésnek, hiszen a PRR aktivált DC-k a DR-ok aktivációjával váltanak ki RIPK1 függő apoptózist a target sejtekben.

Az ígéretesnek tartott DC terápia – a DC-ek változatos módszerekkel történő feltöltése tumor antigénekkal - nem hozott jelentős áttörést a tumorok kezelésében. A PRR-ek tumor környezetben történő aktivációja szintén fejlesztés alatt álló terápiás megközelítés. Eredményeink felvetik a kombimált alkalmazás fontosságát, a DC-ek felhasználást a PRR-indukált aktivációjukat követően, illetve ráirányítják a figyelmet a fagocitózis lehetséges szerepére a DC-ek aktivációs lépéseiben. (A tesztelt terápiák közt már léteznek erre irányuló próbálkozások is.)

(9) Nagyon kevésbé vizsgált terület, hogy az immunrendszer egyes sejtjei, azok altípusai mennyire érzékenyek a különböző sejthalál szignálokra, pedig a sejtípusok eltérő fogékonysága a sejthalál stimulusokra terápiás lehetőséget nyújthat a sejt arányok módosításán keresztül. A pro és antiinflammatorikus sejtek egyensúlyának szabályozása például szövet regenerációt, gyulladásoos betegségeket, elhízást érintő betegségekben is új gyógyászati megközelítés lehetne. Kutatásaink során a tumor környezetben található plasztikus sejtípusokra a makrofágokra és a DC-kre fókuszáltunk. A proinflammatorikus alpopulációk alapvetően a tumor ellenes immunválaszt erősítik, míg az antiinflammatorikus, tolerogén altípusok a tumor képződésnek, az immunelkerülésnek kedveznek. Kimutattuk, hogy az M1 és M2 makrofágok a legtöbb vizsgált apoptotikus és nekroptotikus szignálra egyformán érzékenyek, azonban a TAK1 inhibitor jelenlétében indukált nekroptózis az M2 sejtekben szignifikánsan erősebb sejthalált indukált. A tumor asszociált makrofágok, jellemzően M2 szerű sejtek, ennek megfelelően TAK1 inhibitor jelenlétében indukált nekroptózis a TAM-okban is intenzív sejthalált okozott. TAK1 inhibitorok lehetséges felhasználását jelenleg különböző fázisú klinikai vizsgálatokban tesztelik, így autoinflammatorikus, autoimmun kórképekben és különböző tumorokban [162], [163]. Eredményeink szerint a TAK1 inhibitorok használta sikeresebb lehet a tumor terápiában, mint a SMAC mimetikumoké, mivel a TAK1 gátlása nem csak a tumor sejtek elhalását indukálja, de a tumor környezet összetételét is kedvezően módosíthatja.

További érdekes aspektusa megfigyeléseinknek, hogy a SMAC mimetikumok és a TAK1 inhibitorok által indukált nekroptózis eltérően működik, ami arra utal, hogy többféle nekroptotikus útvonal, vagy ennek többféle szabályzási lehetősége működhet, sejtípus specifikus regulációt lehetővé téve.

Eredményeink alapján a TAK1-mediált túlélőjel nélkülözhetetlen az M2/TAM sejtek számára, de nem feltétlen szükséges az M1 makrofágoknak, ami újdonságot jelent a két altípus intenzíven vizsgált jelpályáinak összehasonlításában is. Kimutattuk, hogy az Aurora A kináz gátlásával az M1 makrofágok is érzékennyé válnak a TAK1 inhibitor indukált nekroptózisra, így feltételezzük, hogy az M1 sejtekben egy AURKA-mediált túlélő jel is működik, szemben az M2 altípussal. Ennek megfelelően magasabb AURKA expressziót mutattak ki M1 sejtekben, és ez a kináz részt vesz a makrofágok M1 irányú polarizációjában is [164].

Kutatásainkkal párhuzamosan néhány tanulmányban összehasonlították az M1 és M2 sejthalál érzékenységét. Kimutatták, hogy egér csontvelői makrofágokból differenciáltatott M1 sejtek kevésbé voltak érzékenyek a GPX4 inhibitor, RSL3-mal-indukált ferroptózissal szemben, mint az M2 sejtek [165], viszont az egér M1 sejteket érzékenyebbnak találták TNF/ SMAC mimetikum/kaspáz inhibitor koktél által indukált nekroptózisra, mint M2 sejteket [166]. Humán monocitából differenciáltatott M1 sejtek szenzitívebbnek bizonyultak a SMAC mimetikummal indukált apoptózisra [167]. Összességében megállapíthatjuk, hogy az M1-M2 polarizált makrofág populációk összetétele befolyásolható eltérő sejthalál érzékenységükön keresztül, ami új terápiás megközelítéseket tesz lehetővé.

A tumor terápiában különböző módokon próbálják a tumor mikro környezetben található sejt altípusok arányait befolyásolni. Makrofágok kemotaxisának, differenciációjának és néhány közleményben a sejthalálának lehetséges szabályozását tanulmányozzák [92], [143]. A DC alpopulációk egyensúlyának manipulálására kevesebb kutatás fókuszál, pedig a DC-k a tumor ellenes immunválasz több fázisát is szabályozhatják. A másodlagos immunszervekben a naiv T sejtek számra prezentálják az antigéneket, a tumor környezetben proinflammatorikus, vagy immunszuppresszív funkciójúak lehetnek, befolyásolhatják a helper T sejt altípusok működését, továbbá szerepük lehet a metasztázisok kialakulásában is [168], [169].

A kemoterápiás szerek hatása a tumor sejtek sejthalálára intenzíven vizsgált, azonban keveset tudunk, hogy hogyan módosítják a tumor környezetben található plasztikus sejtek arányát, működését. Mivel kimutattuk, hogy a pro és antiinflammatorikus sejtek sejthalál érzékenysége meghatározott szignálokkal szemben eltérő, felmerült, hogy vajon a már használt, engedélyezett szerek befolyásolják-e az alpopulációk összetételét.

Kimutattuk, hogy az M1 makrofágok érzékenyebbek a doxorubicin indukált sejthalálra, mint az M2 altípus. A dendritikus sejteket vizsgálva azonban az oxaliplatin, doxorubicin és epirubicin kezelést követően is a tolerogén DC populáció mutatott intenzívebb sejthalált. Ugyanakkor DC-ek esetében egyik szer sem okozott a vizsgált kísérleti körülmények között szignifikáns különbséget.

Az egyes kemoterápiás szerek hatása eltérőnek mutatkozott a makrofág és DC alpopulációk differenciációját, citokin termelését, kemotaxisát, valamint T sejt polarizáló képességét vizsgálva. Így például antraciklinek jelenlétében differenciáltatott DC-kben megnövekedett a CTLA-4 expressziója, illetve nagy dóziszú ciszplatin és az alacsony dóziszú epirubicin jelenléte a DC-k differenciációja során

## koncz.gabor\_172\_24

fokozta a DC-k regulátor T-sejtekre kifejtett promótáló hatását. Összességében ezen eredményeink megerősítik, hogy a hasonló alapon ható kemoterápiás szerek is eltérő hatással lehetnek a daganatellenes immunválaszra a tumor mikrokörnyezet működésének szabályozásán keresztül. A kezelés optimális dózisa, a kemoterápia időzítése, a kombinációk összetétele meghatározhatja a tumor immunitását és a daganatok metasztatikus potenciálját.

## 7 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 tirozin-foszforilációt eredményez, mint az érett populációban.
- érett B sejtekben a BCR aktivációt követően a Gab2 adapter fehérje tirozinon foszforilálódik, míg éretlen B sejtekben ez nem volt megfigyelhető.
- 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 sejtjeink 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 kaskád 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 ölü funkcióinak hatására Fas receptor jelenlétében főként apoptotikus sejthalál indukálódott, Fas hiányában azonban sem DNS fragmentáció sem kaszpáz-3 aktivitás nem volt kimutatható
- a szekretált vezikulumok általi aktiváció a klasszikus Fas-FADD-kaspáz-8 jelpálya helyett, a Fas-függő RIPK1-kaspáz-8 útvonalon keresztül okozott apoptózist.
- LPS vagy CL075 aktivációt követően a humán éretlen monocita eredetű dendritik 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 kaszpáz-9 hiányos megfelelőikben nem.
- A kaszpáz-9 *in vivo* hozzájárul a cerulein által kiváltott hasnyálmirigy-gyulladás kialakulásához.
- A kaszpáz-9 szabályozza a nekroszóma kialakulását.
- Az AURKA vagy szubsztrátja, a GSK3 $\beta$  gátlása helyreállította a kaszpáz-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 sejtípus 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 $\beta$  inhibitorok jelenlétében az M1 makrofágok is érzékennyé 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.



## 8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Debreceni Egyetem Immunológiai Intézet vezetőinek támogatását; Prof. Rajnavölgyi Évának, hogy meghívott az intézetbe és felhívta a figyelmem a természetes immunitás szépségeire. Prof. Bíró Tamásnak, hogy bízott bennem, inspirált, ennek köszönhetően vezetése alatt munkám eredményebbé vált. Prof. Bácsi Attilának állandó segítőkészségét, hogy bátorított és szakmai előrelépésemhez minden segítséget megadott. Köszönettel tartozom Anne-Odile Hueber-nek, hogy a Nizzai Sejthalál laboratóriumban és Prof. Erdei Annának, hogy az ELTE immunológiai tanszékén posztdoktorként dolgozhattam.

Nagyon köszönöm Dr. Mázló Anett pozitivitását, stimuláló segítségét, valamint PhD és MSc hallgatóimnak, elsősorban Hancz Anikónak, Hancz Dórának, Molnár Tamásnak, Szabó Anikónak, Rácz Evelinnek, Varga Zsófiának, Jenei Viktóriának, Burai Sárának lelkes munkájukat, energiájukat, ami ezen dolgozat megszületéséhez vezetett. Köszönöm nekik, hogy a közös munka minden nap örömet jelentett. Köszönöm Debreceni Zsuzsának az évek során nyújtott folyamatos technikai segítségét.

Hálásan köszönöm a Debreceni Immunológiai Intézetben és az ELTE Immunológiai Tanszékén dolgozó minden munkatársamnak, kiemelten Nagyné-Kovács Erzsébetnek, Orosz-Tóth Katalinnak, Kiss Anikónak, Rácz Andreának, Németh Tamarának jószándékukat és hogy segítségükkel és türelmükkel támogatták a munkámat.

Köszönöm összes kollaborációs partnerünknek, elsősorban Prof Sármai Gabriellának, Prof. Virág Lászlónak, Dr Maléth Józsefnek, Dr Király Róbertnek, Prof Ábrahám Beátának, Dr. Krittalak Chackrabandhu-nak nélkülözhetetlen segítségüket.

## 9 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK, TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

### 9.1 Tudománymetriai 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

Felsőoktatási tankönyvek száma: 2

angol nyelven: 1

magyar nyelven: 1

## 9.2 Az értekezést megalapozó közlemények (tematikus sorrendben)

1. Koncz, Gábor ; Bodor, Csaba ; Kövesdi, Dorottya ; Gáti, Róbert ; Sarmay, Gabriella ☒  
BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells  
IMMUNOLOGY LETTERS 82 : 1-2pp. 41-49. , 9 p. (2002)  
IF: 1.847  
Független idéző: 45 Függő idéző: 2 Összesen: 47
2. Hancz, Anikó ; Hérincs, Z ; Neer, Z ; Sarmay, G ☒ ; Koncz, G  
Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) and Fas (CD95)  
IMMUNOLOGY LETTERS 116 : 2pp. 211-217. , 7 p. (2008)  
IF: 2.858  
Független idéző: 4 Függő idéző: 2 Összesen: 6
3. 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 AND DIFFERENTIATION 15 : 3pp. 494-503. , 10 p. (2008)  
IF: 7.548  
Független idéző: 14 Függő idéző: 3 Összesen: 17
4. Maus, M ; Medgyesi, Dávid ; Kövesdi, Dorottya ; Csuka, Dorottya ; Koncz, Gábor ; Sarmay, Gabriella ☒  
Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival  
CELLULAR SIGNALLING 21 : 2pp. 220-227. , 8 p. (2009)  
IF: 4.094  
Független idéző: 15 Összesen: 15
5. Hancz, A ; Koncz, G ; Szili, D ; Sarmay, G ☒  
TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases  
IMMUNOLOGY LETTERS 143 : 1pp. 77-84. , 8 p. (2012)  
IF: 2.337  
Független idéző: 8 Függő idéző: 2 Összesen: 10
6. Koncz, Gabor ; Hancz, Anikó ; Chakrabandhu, Krittalak ; Gogolak, Peter ; Kerekes, Krisztina ; Rajnavolgyi, Eva ; Hueber, Anne-Odile ☒  
Vesicles Released by Activated T Cells Induce Both Fas-Mediated RIP-Dependent Apoptotic and Fas-Independent Nonapoptotic Cell Deaths  
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 189 : 6pp. 2815-2823. , 9 p. (2012)  
IF: 5.52  
Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10
7. Fekete, T ; Koncz, G ; Szabo, B ; Gregus, A ; Rajnavolgyi, E ☒  
Interferon gamma boosts the nucleotide oligomerization domain 2-mediated signaling pathway in human dendritic cells in an X-linked inhibitor of apoptosis protein and mammalian target of rapamycin-dependent manner  
CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY 14 : 4pp. 380-391. , 12 p. (2017)  
IF: 7.551  
Független idéző: 6 Összesen: 6
8. Hancz, D ; Szabo, A ; Molnar, T ; Varga, Z ; Hancz, Anikó ; Gregus, A ; Hueber, AO ; Rajnavolgyi, E ; Koncz, G ☒  
Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner  
IMMUNOLOGY LETTERS 193 pp. 42-50. , 9 p. (2018)  
IF: 2.552  
Független idéző: 10 Függő idéző: 1 Összesen: 11
9. Varga, Zsófia ; Molnár, Tamás ; Mázló, Anett ; Kovács, Ramóna ; Jenei, Viktória ; Kerekes, Krisztina ; Bácsi, Attila ; Koncz, Gábor ☒  
Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis  
CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY 69 : 11pp. 2193-2207. , 15 p. (2020)  
IF: 6.968  
Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7

10. Molnár, Tamás ; Pallagi, Petra ; Tél, Bálint ; Király, Róbert ; Csoma, Eszter ; Jenei, Viktória ; Varga, Zsófia ; Gogolák, Péter ; Hueber, Anne Odile ; Máté, Zoltán et al.  
Caspase-9 acts as a regulator of necroptotic cell death  
FEBS JOURNAL 288 : 22pp. 6476-6491. , 16 p. (2021)  
IF: 5.622  
Független idéző: 14 Függő idéző: 1 Összesen: 15
11. Varga, Zsófia ; Rácz, Evelin ; Mázló, Anett ; Korodi, Mónika ; Szabó, Anikó ; Molnár, Tamás ; Szöör, Árpád ; Veréb, Zoltán ; Bácsi, Attila ; Koncz, Gábor ✉  
Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death  
IMMUNOBIOLOGY 226 : 1Paper: 152032 , 7 p. (2021)  
IF: 3.152  
Független idéző: 3 Függő idéző: 2 Összesen: 5
12. Jenei, Viktória ; Burai, Sára ; Molnár, Tamás ; Kardos, Balázs ; Mácsik, Rebeka ; Tóth, Márta ; Debreceni, Zsuzsanna ; Bácsi, Attila ; Mázló, Anett ✉ ; Koncz, Gábor ✉  
Comparison of the immunomodulatory potential of platinum-based anti-cancer drugs and anthracyclins on human monocyte-derived cells  
CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY 91 : 1pp. 53-56. , 4 p. (2023)  
IF: 3 \*

### 9.3 Saját közlemények

1. Sarmay, G ; Rozsnyay, Z ; Koncz, G ; Danilkovich, A ; Gergely, J  
The alternative splicing of human FcγRII mRNA is regulated by activation of B cells with mIgM cross-linking, interleukin-4, or phorbol ester  
EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 25 : 1pp. 262-268. , 7 p. (1995)  
IF: 6.015  
Független idéző: 14 Függő idéző: 8 Összesen: 22
2. Sarmay, G ✉ ; Rozsnyay, Z ; Koncz, G ; Gergely, J  
Interaction of signaling molecules with human FcγRIIb1 and the role of various FcγRIIb isoforms in B-cell regulation  
IMMUNOLOGY LETTERS 44 : 2-3pp. 125-131. , 7 p. (1995)  
IF: 1.241  
Független idéző: 6 Függő idéző: 6 Összesen: 12
3. Kaldi, K ; Szaszi, K ; Koncz, G ; Susztak, K ; Ligeti, E ✉  
Arachidonic acid activatable electrogenic H<sup>+</sup> transport in the absence of cytochrome b(558) in human T lymphocytes  
FEBS LETTERS 381 : 1-2pp. 156-160. , 5 p. (1996)( ) IF: 3.75 Folyóiratcikk (Szakcikk )  
Független idéző: 12 Függő idéző: 1 Összesen: 13
4. Sarmay, G ✉ ; Koncz, G ; Gergely, J  
Integration of activatory and inhibitory signals in human B-cells  
IMMUNOLOGY LETTERS 54 : 2-3pp. 93-100. , 8 p. (1996)  
IF: 1.255  
Független idéző: 14 Függő idéző: 7 Összesen: 21
5. Sarmay, G ✉ ; Koncz, G ; Gergely, J  
Human type II Fcγ receptors inhibit B cell activation by interacting with the p21(ras)-dependent pathway  
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 271 : 48pp. 30499-30504. , 6 p. (1996)  
IF: 7.452  
Független idéző: 26 Függő idéző: 8 Összesen: 34
6. Sarmay, Gabriella ✉ ; Koncz, Gábor ; Pecht, I ; Gergely, János  
Fcγ receptor type IIb induced recruitment of inositol and protein phosphatases to the signal transducing complex of human B-cell  
IMMUNOLOGY LETTERS 57 : 1-3pp. 159-164. , 6 p. (1997)  
IF: 1.096  
Független idéző: 20 Függő idéző: 7 Összesen: 27
7. Koncz, Gábor ; Gergely, János ; Sarmay, Gabriella ✉  
Fc gammaRIIb inhibits both B cell receptor- and CD19-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in Fc gammaR-transfected human B cells  
INTERNATIONAL IMMUNOLOGY 10 : 2pp. 141-146. , 6 p. (1998)  
IF: 3.188  
Független idéző: 17 Függő idéző: 4 Összesen: 21
8. Koncz, G ; Pecht, I ; Gergely, J ; Sarmay, G ✉  
Fcγ receptor-mediated inhibition of human B cell activation: the role of SHP-2 phosphatase  
EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 29 : 6pp. 1980-1989. , 10 p. (1999)  
IF: 5.635  
Független idéző: 12 Függő idéző: 7 Összesen: 19
9. Sarmay, Gabriella ✉ ; Koncz, Gábor ; Pecht, I ; Gergely, János  
Cooperation between SHP-2, phosphatidylinositol 3-kinase and phosphoinositide 5-phosphatase in the FcγRIIb mediated B cell regulation  
IMMUNOLOGY LETTERS 68 : 1pp. 25-34. , 10 p. (1999)  
IF: 1.494  
Független idéző: 9 Függő idéző: 8 Összesen: 17

## koncz.gabor\_172\_24

10. Kurucz, I ✉ ; Hilbert, Ágnes ; Kapus, Attila ; Medgyesi, Dávid ; Koncz, Gábor ; Sarmay, Gabriella ; Erdei, Anna ; Gergely, János  
Bacterially expressed human FcγRIIb is soluble and functionally active after in vitro refolding  
IMMUNOLOGY LETTERS 75 : 1pp. 33-40. , 8 p. (2000)  
IF: 1.546  
Független idéző: 15 Fügő idéző: 3 Összesen: 18
11. Koncz, Gábor ; Tóth, Gábor ; Bökönyi, Györgyi ; Kéri, György ; Pecht, I ; Medgyesi, Dávid ; Gergely, János ; Sarmay, Gabriella ✉  
Co-clustering of Fcγ and B cell receptors induces dephosphorylation of the Grb2-associated binder 1 docking protein  
EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY 268 : 14pp. 3898-3906. , 9 p. (2001)  
IF: 2.849  
Független idéző: 22 Fügő idéző: 13 Összesen: 35
12. Koncz, Gábor ; Bodor, Csaba ; Kövesdi, Dorottya ; Gáti, Róbert ; Sarmay, Gabriella ✉  
BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells  
IMMUNOLOGY LETTERS 82 : 1-2pp. 41-49. , 9 p. (2002)  
IF: 1.847  
Független idéző: 45 Fügő idéző: 2 Összesen: 47
13. Kovesdi, D ; Koncz, G ; Ivanyi-Nagy, R ; Caspi, Y ; Ishiai, M ; Kurosaki, T ; Gergely, J ; Haimovich, J ; Sarmay, G ✉  
Developmental differences in B cell receptor-induced signal transduction  
CELLULAR SIGNALLING 14 : 6pp. 563-572. , 10 p. (2002)  
IF: 4.362 Független idéző: 7 Fügő idéző: 1 Összesen: 8
14. Sarmay, G ✉ ; Koncz, G ; Bodor, C ; Kovesdi, D ; Gati, R  
Signaling pathways leading to apoptosis or survival in immature and mature B cells  
ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES 973 : 1pp. 181-185. , 5 p. (2002)  
IF: 1.682  
Független idéző: 1 Fügő idéző: 2 Összesen: 3
15. Medgyesi, Dávid ; Sárközi, Rita ; Koncz, Gábor ; Arató, Krisztina ; Várad, Györgyi ; Tóth, GK; Sarmay, Gabriella ✉  
Functional consequences of a MAPK docking site on human FcγRIIb  
IMMUNOLOGY LETTERS 92 : 1-2pp. 83-90. , 8 p. (2004)  
IF: 2.136  
Független idéző: 1 Fügő idéző: 1 Összesen: 2
16. Medgyesi, Dávid ; Uray, Katalin ; Sallai, Krisztina ; Hudecz, Ferenc ; Koncz, Gábor ; Abramson, J ; Pecht, I ; Sarmay, Gabriella ; Gergely, János ✉  
Functional mapping of the FcγRII binding site on human IgG1 by synthetic peptides  
EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 34 : 4pp. 1127-1135. , 9 p. (2004)  
IF: 5.005  
Független idéző: 14 Összesen: 14
17. Hancz, Anikó ; Hérincs, Z ; Neer, Z ; Sarmay, G ✉ ; Koncz, G  
Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) and Fas (CD95)  
IMMUNOLOGY LETTERS 116 : 2pp. 211-217. , 7 p. (2008)  
IF: 2.858 Független idéző: 4 Fügő idéző: 2 Összesen: 6
18. 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 AND DIFFERENTIATION 15 : 3pp. 494-503. , 10 p. (2008)  
IF: 7.548  
Független idéző: 14 Fügő idéző: 3 Összesen: 17
19. Maus, M ; Medgyesi, Dávid ; Kövesdi, Dorottya ; Csuka, Dorottya ; Koncz, Gábor ; Sarmay, Gabriella ✉  
Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival  
CELLULAR SIGNALLING 21 : 2pp. 220-227. , 8 p. (2009)  
IF: 4.094 Független idéző: 15 Összesen: 15

20. Hancz, A ; Koncz, G ; Szili, D ; Sarmay, G ✉  
TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases  
IMMUNOLOGY LETTERS 143 : 1pp. 77-84. , 8 p. (2012)  
IF: 2.337  
Független idéző: 8 Függő idéző: 2 Összesen: 10
21. Koncz, Gabor ; Hancz, Anikó ; Chakrabandhu, Krittalak ; Gogolak, Peter ; Kerekes, Krisztina ;  
Rajnavolgyi, Eva ; Hueber, Anne-Odile ✉  
Vesicles Released by Activated T Cells Induce Both Fas-Mediated RIP-Dependent Apoptotic and Fas-  
Independent Nonapoptotic Cell Deaths  
JOURNAL OF IMMUNOLOGY 189 : 6pp. 2815-2823. , 9 p. (2012)  
IF: 5.52  
Független idéző: 7 Függő idéző: 3 Összesen: 10
22. Koncz, G ; Hueber, AO  
The Fas/CD95 Receptor Regulates the Death of Autoreactive B Cells and the Selection of Antigen-  
Specific B Cells.  
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 3 Paper: 207 , 12 p. (2012)  
Független idéző: 46 Összesen: 46
23. Kovacs, E ; Szilagyi, L ; Koncz, G ; Lanyi, S ; Abraham, B ✉  
Enhanced In Vitro Refolding of Soluble Human Glucocorticoid-Induced TNF Receptor-Related Ligand  
APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY 170 : 4pp. 819-830. , 12 p. (2013)  
IF: 1.687  
Független idéző: 2 Függő idéző: 1 Összesen: 3
24. Fekete, T ; Pazmandi, K ; Szabo, A ; Bacsı, A ; Koncz, G ; Rajnavolgyi, E ✉  
The antiviral immune response in human conventional dendritic cells is controlled by the mammalian  
target of rapamycin  
JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 96 : 4pp. 579-589. , 11 p. (2014)  
IF: 4.289  
Független idéző: 8 Függő idéző: 2 Összesen: 10
25. Szabo, A ✉ ; Fekete, T ; Koncz, G ; Kumar, BV ; Pazmandi, K ; Foldvari, Z ; Hegedus, B ; Garay, T ;  
Bacsı, A ; Rajnavolgyi, E et al.  
RIG-I inhibits the MAPK-dependent proliferation of BRAF mutant melanoma cells via MKP-1  
CELLULAR SIGNALLING 28 : 5pp. 335-347. , 13 p. (2016)  
IF: 3.937  
Független idéző: 20 Függő idéző: 1 Összesen: 21
26. Fekete, T ; Koncz, G ; Szabo, B ; Gregus, A ; Rajnavolgyi, E ✉  
Interferon gamma boosts the nucleotide oligomerization domain 2-mediated signaling pathway in human  
dendritic cells in an X-linked inhibitor of apoptosis protein and mammalian target of rapamycin-dependent  
manner  
CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY 14 : 4pp. 380-391. , 12 p. (2017)  
IF: 7.551  
Független idéző: 6 Összesen: 6
27. Emri, G ✉ ; Paragh, G ; Tosaki, Agnes ; Janka, E ; Kollar, S ; Hegedus, C ; Gellen, E ; Horkay, I ;  
Koncz, G ; Remenyik, E  
Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: An update  
JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY 185 pp. 169-175. , 7 p.  
(2018)  
IF: 4.067  
Független idéző: 40 Függő idéző: 8 Összesen: 48
28. Hancz, D ; Szabo, A ; Molnar, T ; Varga, Z ; Hancz, Anikó ; Gregus, A ; Hueber, AO ; Rajnavolgyi, E ;  
Koncz, G ✉  
Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner  
IMMUNOLOGY LETTERS 193 pp. 42-50. , 9 p. (2018)  
IF: 2.552  
Független idéző: 10 Függő idéző: 1 Összesen: 11

29. Szabo, Attila ✉ ; Gogolak, Peter ; Koncz, Gabor ; Foldvari, Zsafia ; Pazmandi, Kitti; Miltner, Noemi ; Poliska, Szilard ; Bacs, Attila ; Djurovic, Srdjan ;Rajnavolgyi, Eva  
Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT2B in a subset of human dendritic cells  
SCIENTIFIC REPORTS 8 Paper: 1765 , 12 p. (2018)  
IF: 4.011  
Független idéző: 45 Függő idéző: 2 Összesen: 47
30. Hornyák, Lilla ; Dobos, Nikoletta\* ; Koncz, Gábor ; Karányi, Zsolt ; Páll, Dénes ; Szabó, Zoltán; Halmos, Gábor ; Székvölgyi, L ✉  
The role of indoleamine-2,3-dioxygenase in cancer development, diagnostics, and therapy  
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 9 Paper: 151 , 8 p. (2018)  
IF: 4.716  
Független idéző: 236 Összesen: 236
31. Molnar, Tamas ; Mazlo, Anett\* ; Tslaf, Vera ; Szollosi, Attila Gabor ; Emri, Gabriella ; Koncz, Gabor ✉  
Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis  
CELL DEATH AND DISEASE 10 Paper: 860 , 21 p. (2019)  
IF: 6.304  
Független idéző: 59 Függő idéző: 4 Összesen: 63
32. Varga, Zsófia ; Molnár, Tamás ; Mázló, Anett ; Kovács, Ramóna ; Jenei, Viktória ; Kerekes, Krisztina ; Bácsi, Attila ; Koncz, Gábor ✉  
Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis  
CANCER IMMUNOLOGY IMMUNOTHERAPY 69 : 11pp. 2193-2207. , 15 p. (2020)  
IF: 6.968  
Független idéző: 4 Függő idéző: 3 Összesen: 7
33. Veréb, Zoltán ; Mázló, Anett ; Szabó, Attila ; Póliska, Szilárd ; Kiss, Attila ; Litauszky, Krisztina ; Koncz, Gábor ; Boda, Zoltán ; Rajnavölgyi, Éva ;Bácsi, Attila ✉  
Vessel Wall-Derived Mesenchymal Stromal Cells Share Similar Differentiation Potential and Immunomodulatory Properties with Bone Marrow-Derived Stromal Cells  
STEM CELLS INTERNATIONAL 2020 Paper: 8847038 , 16 p. (2020)  
IF: 5.443  
Független idéző: 3 Függő idéző: 1 Összesen: 4
34. Molnár, Tamás ; Pallagi, Petra ; Tél, Bálint ; Király, Róbert ; Csoma, Eszter ; Jenei, Viktória ; Varga, Zsófia ; Gogolak, Péter ; Hueber, Anne Odile ;Máté, Zoltán et al.  
Caspase-9 acts as a regulator of necroptotic cell death  
FEBS JOURNAL 288 : 22pp. 6476-6491. , 16 p. (2021)  
IF: 5.622  
Független idéző: 14 Függő idéző: 1 Összesen: 15
35. Varga, Zsófia ; Rácz, Evelin ; Mázló, Anett ; Korodi, Mónika ; Szabó, Anikó ; Molnár, Tamás ; Szöör, Árpád ; Veréb, Zoltán ; Bácsi, Attila ; Koncz,Gábor ✉  
Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death  
IMMUNOBIOLOGY 226 : 1Paper: 152032 , 7 p. (2021)  
IF: 3.152  
Független idéző: 3 Függő idéző: 2 Összesen: 5
36. Bugya, Zsófia ; Prechl, József\* ; Szénási, Tibor ; Nemes, Éva ; Bácsi, Attila ; Koncz, Gábor ✉  
Multiple Levels of Immunological Memory and Their Association with Vaccination  
VACCINES (BASEL) 9 : 2Paper: 174 , 24 p. (2021) I  
F: 4.961  
Független idéző: 5 Összesen: 5
37. Prechl, József ; Szöllősi, Attila ; Koncz, Gábor  
A SARS-CoV-2 aktivált adaptív immunválasz és a vakcinációindukált védelem komponensei  
IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 13 : 4pp. 20-28. , 9 p. (2021)
38. Mázló, Anett ; Jenei, Viktória ; Burai, Sára ; Molnár, Tamás ; Bácsi, Attila ; Koncz, Gábor ✉  
Types of necroinflammation, the effect of cell death modalities on sterile inflammation  
CELL DEATH AND DISEASE 13 : 5Paper: 423 , 11 p. (2022)  
IF: 9  
Független idéző: 13 Függő idéző: 2 Összesen: 15



39. Burai, Sára ; Kovács, Ramóna ; Molnár, Tamás ; Tóth, Márta ; Szendi-Szatmári, Tímea ; Jenei, Viktória ; Bíró-Debreceeni, Zsuzsanna ; Brisco, Shlomie ; Balázs, Margit ; Bácsi, Attila et al.  
Comprehensive analysis of different tumor cell-line produced soluble mediators on the differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells  
PLOS ONE 17 : 10 Paper: e0274056 , 23 p. (2022)  
IF: 3.7
40. Jenei, Viktória ; Burai, Sára ; Molnár, Tamás ; Kardos, Balázs ; Mácsik, Rebeka ; Tóth, Márta ; Debreceeni, Zsuzsanna ; Bácsi, Attila ; Mázló, Anett ✉ ; Koncz, Gábor ✉  
Comparison of the immunomodulatory potential of platinum-based anti-cancer drugs and anthracyclins on human monocyte-derived cells  
CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY 91 : 1pp. 53-56. , 4 p. (2023)  
IF: 3 \*
41. Koncz, Gábor ; Jenei, Viktória ; Tóth, Márta ; Váradi, Eszter ; Kardos, Balázs ; Bácsi, Attila ; Mázló, Anett ✉  
Damage-mediated macrophage polarization in sterile inflammation  
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 14 Paper: 1169560 , 18 p. (2023)  
IF: 7.3 \*  
Független idéző: 3 Összesen: 3
42. Mázló, Anett ✉ ; Tang, Yidan\* ; Jenei, Viktória ; Brauman, Jessica ; Yousef, Heba ; Bácsi, Attila ; Koncz, Gábor ✉  
Resolution Potential of Necrotic Cell Death Pathways  
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 24 : 1 Paper: 16 , 23 p. (2023)  
IF: 5.6  
Független idéző: 2 Független idéző: 1 Összesen: 3
43. Muzsai, Szabolcs ; Maryanovsky, Ore-Matan ; Ander, Roland ; Koncz, Gábor ; Türk-Mázló, Anett\*\* ; Bácsi, Attila\*\* ✉ ; Tóth, Márta  
Cell-Free Supernatant Derived from a Lactobacillus casei BL23 Culture Modifies the Antiviral and Immunomodulatory Capacity of Mesenchymal Stromal Cells  
BIOMEDICINES 11 : 6 Paper: 1521 , 19 p. (2023)  
IF: 4.7 \*

## 10 IRODALOMJEGYZÉK

1. Bratton, S.B. and G.S. Salvesen, *Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 19): p. 3209-14.
2. Bock, F.J. and S.W.G. Tait, *Mitochondria as multifaceted regulators of cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020. **21**(2): p. 85-100.
3. Naim, S. and T. Kaufmann, *The Multifaceted Roles of the BCL-2 Family Member BOK*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 574338.
4. Llambi, F., et al., *BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation*. Cell, 2016. **165**(2): p. 421-33.
5. Upton, J.P., et al., *The N-terminal conformation of Bax regulates cell commitment to apoptosis*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 932-42.
6. Vandenabeele, P., G. Bultynck, and S.N. Savvides, *Pore-forming proteins as drivers of membrane permeabilization in cell death pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023. **24**(5): p. 312-333.
7. Singh, R., A. Letai, and K. Sarosiek, *Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(3): p. 175-193.
8. Willis, S.N. and J.M. Adams, *Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis*. Curr Opin Cell Biol, 2005. **17**(6): p. 617-25.
9. Opferman, J.T., *Apoptosis in the development of the immune system*. Cell Death Differ, 2008. **15**(2): p. 234-42.
10. Wang, J., et al., *Puma, noxa, p53, and p63 differentially mediate stress pathway induced apoptosis*. Cell Death Dis, 2021. **12**(7): p. 659.
11. Kale, J., E.J. Osterlund, and D.W. Andrews, *BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death*. Cell Death Differ, 2018. **25**(1): p. 65-80.
12. Brunelle, J.K. and A. Letai, *Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 437-41.
13. Verhagen, A.M., E.J. Coulson, and D.L. Vaux, *Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs*. Genome Biol, 2001. **2**(7): p. REVIEWS3009.
14. Fulda, S. and D. Vucic, *Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(2): p. 109-24.
15. Vande Walle, L., M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, *The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 453-60.
16. Obexer, P. and M.J. Ausserlechner, *X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 197.
17. Dumetier, B., A. Zadoroznyj, and L. Dubrez, *IAP-Mediated Protein Ubiquitination in Regulating Cell Signaling*. Cells, 2020. **9**(5).
18. Avrutsky, M.I. and C.M. Troy, *Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression in Human Disease*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 701301.
19. Li, P., et al., *Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application*. Oncotarget, 2017. **8**(14): p. 23996-24008.
20. Rossin, A., G. Miloro, and A.O. Hueber, *TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity*. Cancers (Basel), 2019. **11**(5).
21. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. **457**(7232): p. 1019-22.
22. Salvesen, G.S. and S.J. Riedl, *Structure of the Fas/FADD complex: a conditional death domain complex mediating signaling by receptor clustering*. Cell Cycle, 2009. **8**(17): p. 2723-7.
23. Smyth, P., et al., *FLIP(L): the pseudo-caspase*. FEBS J, 2020. **287**(19): p. 4246-4260.
24. Barnhart, B.C., E.C. Alappat, and M.E. Peter, *The CD95 type I/type II model*. Semin Immunol, 2003. **15**(3): p. 185-93.

25. Schneider, P. and J. Tschopp, *Apoptosis induced by death receptors*. Pharm Acta Helv, 2000. **74**(2-3): p. 281-6.
26. Newton, K., et al., *Cleavage of RIPK1 by caspase-8 is crucial for limiting apoptosis and necroptosis*. Nature, 2019. **574**(7778): p. 428-431.
27. Gajate, C. and F. Mollinedo, *The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3860-3.
28. Parlato, S., et al., *CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway*. EMBO J, 2000. **19**(19): p. 5123-34.
29. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. Nature, 1992. **356**(6367): p. 314-7.
30. Lenardo, M.J., et al., *ALPS-ten lessons from an international workshop on a genetic disease of apoptosis*. Immunity, 2010. **32**(3): p. 291-5.
31. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. Cell, 1995. **81**(6): p. 935-46.
32. Rieux-Laucat, F., et al., *Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity*. Science, 1995. **268**(5215): p. 1347-9.
33. Lee, K.H., et al., *The role of receptor internalization in CD95 signaling*. EMBO J, 2006. **25**(5): p. 1009-23.
34. Molnar, T., et al., *Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis*. Cell Death Dis, 2019. **10**(11): p. 860.
35. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 489-95.
36. Gerlach, B., et al., *Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling*. Nature, 2011. **471**(7340): p. 591-6.
37. O'Donnell, M.A., et al., *Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(12): p. 1437-42.
38. Kaiser, W.J., et al., *Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL*. J Biol Chem, 2013. **288**(43): p. 31268-79.
39. Orozco, S., et al., *RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis*. Cell Death Differ, 2014. **21**(10): p. 1511-21.
40. Kondylis, V. and M. Pasparakis, *RIP Kinases in Liver Cell Death, Inflammation and Cancer*. Trends Mol Med, 2019. **25**(1): p. 47-63.
41. Thapa, R.J., et al., *Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(33): p. E3109-18.
42. Dondelinger, Y., et al., *RIPK3 contributes to TNFR1-mediated RIPK1 kinase-dependent apoptosis in conditions of cIAP1/2 depletion or TAK1 kinase inhibition*. Cell Death Differ, 2013. **20**(10): p. 1381-92.
43. Tonnus, W., et al., *Die later with ESCRT!* Oncotarget, 2017. **8**(26): p. 41790-41791.
44. Fan, W., et al., *Flotillin-mediated endocytosis and ALIX-syntenin-1-mediated exocytosis protect the cell membrane from damage caused by necroptosis*. Sci Signal, 2019. **12**(583).
45. Chen, W., et al., *Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(4): p. 434-44.
46. Xie, Y., et al., *Inhibition of Aurora Kinase A Induces Necroptosis in Pancreatic Carcinoma*. Gastroenterology, 2017. **153**(5): p. 1429-1443 e5.
47. Li, D., et al., *A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(16): p. 5017-22.
48. Agueda-Pinto, A., et al., *Convergent Loss of the Necroptosis Pathway in Disparate Mammalian Lineages Shapes Viruses Countermeasures*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 747737.
49. Jouan-Lanhouet, S., et al., *Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **35**: p. 2-13.

50. Koncz, G. and A.O. Hueber, *The Fas/CD95 Receptor Regulates the Death of Autoreactive B Cells and the Selection of Antigen-Specific B Cells*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 207.
51. Verbrugge, I., et al., *Radiation and anticancer drugs can facilitate mitochondrial bypass by CD95/Fas via c-FLIP downregulation*. Cell Death Differ, 2010. **17**(3): p. 551-61.
52. Stranges, P.B., et al., *Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity*. Immunity, 2007. **26**(5): p. 629-41.
53. Hao, Z., et al., *Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis*. Immunity, 2008. **29**(4): p. 615-27.
54. Chu, J.L., et al., *Massive upregulation of the Fas ligand in lpr and gld mice: implications for Fas regulation and the graft-versus-host disease-like wasting syndrome*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 393-8.
55. Komano, H., et al., *Severe impairment of B cell function in lpr/lpr mice expressing transgenic Fas selectively on B cells*. Int Immunol, 1999. **11**(7): p. 1035-42.
56. Wang, J. and T. Watanabe, *Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells*. Int Rev Immunol, 1999. **18**(4): p. 367-79.
57. Mizuno, T., X. Zhong, and T.L. Rothstein, *Fas-induced apoptosis in B cells*. Apoptosis, 2003. **8**(5): p. 451-60.
58. Ait-Azzouzene, D., et al., *Deletion of IgG-switched autoreactive B cells and defects in Fas(lpr) lupus mice*. J Immunol, 2010. **185**(2): p. 1015-27.
59. Janssens, W., et al., *CD4+CD25+ T cells lyse antigen-presenting B cells by Fas-Fas ligand interaction in an epitope-specific manner*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4604-12.
60. Catlett, I.M., et al., *Signaling through MHC class II molecules blocks CD95-induced apoptosis*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6019-24.
61. Carter, R.H. and D.T. Fearon, *CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes*. Science, 1992. **256**(5053): p. 105-7.
62. Barrington, R.A., et al., *CD21/CD19 coreceptor signaling promotes B cell survival during primary immune responses*. J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2859-67.
63. Guzman-Rojas, L., et al., *Life and death within germinal centres: a double-edged sword*. Immunology, 2002. **107**(2): p. 167-75.
64. Wurster, A.L., et al., *Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27169-75.
65. van Eijk, M., et al., *Death-receptor contribution to the germinal-center reaction*. Trends Immunol, 2001. **22**(12): p. 677-82.
66. Schweighoffer, E. and V.L. Tybulewicz, *BAFF signaling in health and disease*. Curr Opin Immunol, 2021. **71**: p. 124-131.
67. Rauch, M., et al., *Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5456.
68. Smulski, C.R. and H. Eibel, *BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2285.
69. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2002. **168**(9): p. 4531-7.
70. Hartmann, G. and A.M. Krieg, *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 944-53.
71. Chan, M.P., et al., *DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 5853.
72. Chaturvedi, A., D. Dorward, and S.K. Pierce, *The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens*. Immunity, 2008. **28**(6): p. 799-809.
73. Santiago-Raber, M.L., L. Baudino, and S. Izui, *Emerging roles of TLR7 and TLR9 in murine SLE*. J Autoimmun, 2009. **33**(3-4): p. 231-8.

74. Notley, C.A., et al., *DNA methylation governs the dynamic regulation of inflammation by apoptotic cells during efferocytosis*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 42204.
75. Tilstra, J.S., et al., *B cell-intrinsic TLR9 expression is protective in murine lupus*. J Clin Invest, 2020. **130**(6): p. 3172-3187.
76. Wang, Z., et al., *Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis*. Cell Immunol, 1997. **180**(2): p. 162-7.
77. Spetz, J., A.G. Presser, and K.A. Sarosiek, *T Cells and Regulated Cell Death: Kill or Be Killed*. Int Rev Cell Mol Biol, 2019. **342**: p. 27-71.
78. Voskoboinik, I., et al., *The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) gene*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 811-6.
79. Martinvalet, D., et al., *Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death*. Cell, 2008. **133**(4): p. 681-92.
80. Hoves, S., et al., *A critical role for granzymes in antigen cross-presentation through regulating phagocytosis of killed tumor cells*. J Immunol, 2011. **187**(3): p. 1166-75.
81. Oyaizu, N., et al., *Requirement of cell-cell contact in the induction of Jurkat T cell apoptosis: the membrane-anchored but not soluble form of FasL can trigger anti-CD3-induced apoptosis in Jurkat T cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 670-5.
82. Tanaka, M., et al., *Downregulation of Fas ligand by shedding*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 31-6.
83. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 511-7.
84. Albanese, J., et al., *Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3862-74.
85. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1274-81.
86. Chen, P., X. Piao, and P. Bonaldo, *Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury*. Acta Neuropathol, 2015. **130**(5): p. 605-18.
87. Koncz, G., et al., *Damage-mediated macrophage polarization in sterile inflammation*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1169560.
88. DeNardo, D.G. and B. Ruffell, *Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2019. **19**(6): p. 369-382.
89. Zotes, T.M., et al., *PI3K p110gamma deletion attenuates murine atherosclerosis by reducing macrophage proliferation but not polarization or apoptosis in lesions*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72674.
90. Nally, F.K., C. De Santi, and C.E. McCoy, *Nanomodulation of Macrophages in Multiple Sclerosis*. Cells, 2019. **8**(6).
91. Lagana, A.S., et al., *Evaluation of M1 and M2 macrophages in ovarian endometriomas from women affected by endometriosis at different stages of the disease*. Gynecol Endocrinol, 2020. **36**(5): p. 441-444.
92. Hourani, T., et al., *Tumor Associated Macrophages: Origin, Recruitment, Phenotypic Diversity, and Targeting*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 788365.
93. Parihar, A., T.D. Eubank, and A.I. Doseff, *Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death*. J Innate Immun, 2010. **2**(3): p. 204-15.
94. Robinson, N., et al., *Programmed necrotic cell death of macrophages: Focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos*. Redox Biol, 2019. **26**: p. 101239.
95. Siegmund, D., et al., *Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis*. Cell Death Dis, 2016. **7**(9): p. e2375.
96. Sanjo, H., et al., *Cutting Edge: TAK1 Safeguards Macrophages against Proinflammatory Cell Death*. J Immunol, 2019. **203**(4): p. 783-788.
97. Worbs, T., S.I. Hammerschmidt, and R. Forster, *Dendritic cell migration in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(1): p. 30-48.
98. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell stress and death*. Nat Immunol, 2022. **23**(4): p. 487-500.

99. Im, S.A., T. Gerelchuluun, and C.K. Lee, *Evidence for Direct Inhibition of MHC-Restricted Antigen Processing by Dexamethasone*. Immune Netw, 2014. **14**(6): p. 328-32.
100. Carbonneil, C., et al., *Dendritic cells generated in the presence of interferon-alpha stimulate allogeneic CD4+ T-cell proliferation: modulation by autocrine IL-10, enhanced T-cell apoptosis and T regulatory type 1 cells*. Int Immunol, 2004. **16**(7): p. 1037-52.
101. Schiavoni, G., F. Mattei, and L. Gabriele, *Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 483.
102. Alfei, F., P.C. Ho, and W.L. Lo, *DCisioN-making in tumors governs T cell anti-tumor immunity*. Oncogene, 2021. **40**(34): p. 5253-5261.
103. Vidalain, P.O., et al., *Cytotoxic activity of human dendritic cells is differentially regulated by double-stranded RNA and CD40 ligand*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3765-72.
104. Chan, C.W. and F. Housseau, *The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells*. Cell Death Differ, 2008. **15**(1): p. 58-69.
105. Chauvin, C. and R. Josien, *Dendritic cells as killers: mechanistic aspects and potential roles*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 11-6.
106. Janjic, B.M., et al., *Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1823-30.
107. Vidalain, P.O., et al., *Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 556-9.
108. Lakomy, D., et al., *Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2775-82.
109. Joo, H.G., et al., *Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors*. Int J Cancer, 2002. **102**(1): p. 20-8.
110. Lu, G., et al., *Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand*. J Immunol, 2002. **168**(4): p. 1831-9.
111. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. Cell Death Differ, 2018. **25**(3): p. 486-541.
112. Yatim, N., et al., *RIPK1 and NF-kappaB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8(+) T cells*. Science, 2015. **350**(6258): p. 328-34.
113. Mazlo, A., et al., *Resolution Potential of Necrotic Cell Death Pathways*. Int J Mol Sci, 2022. **24**(1).
114. Galluzzi, L., et al., *Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death*. J Immunother Cancer, 2020. **8**(1).
115. Zhou, J., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers*. J Cell Mol Med, 2019. **23**(8): p. 4854-4865.
116. Falcon-Beas, C., et al., *Dexamethasone turns tumor antigen-presenting cells into tolerogenic dendritic cells with T cell inhibitory functions*. Immunobiology, 2019. **224**(5): p. 697-705.
117. Koncz, G., et al., *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. **15**(3): p. 494-503.
118. Daigle, I., et al., *Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils*. Nat Med, 2002. **8**(1): p. 61-7.
119. Stebbins, C.C., et al., *Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(17): p. 6291-9.
120. Hancz, A., et al., *Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) and Fas (CD95)*. Immunol Lett, 2008. **116**(2): p. 211-7.
121. Hancz, A., et al., *TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases*. Immunol Lett, 2012. **143**(1): p. 77-84.
122. Koncz, G., et al., *BCR mediated signal transduction in immature and mature B cells*. Immunol Lett, 2002. **82**(1-2): p. 41-9.

123. Carsetti, R., G. Kohler, and M.C. Lamers, *Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment*. J Exp Med, 1995. **181**(6): p. 2129-40.
124. Maus, M., et al., *Grb2 associated binder 2 couples B-cell receptor to cell survival*. Cell Signal, 2009. **21**(2): p. 220-7.
125. Hancz, D., et al., *Flagellin increases death receptor-mediated cell death in a RIP1-dependent manner*. Immunol Lett, 2018. **193**: p. 42-50.
126. Koncz, G., et al., *Vesicles released by activated T cells induce both Fas-mediated RIP-dependent apoptotic and Fas-independent nonapoptotic cell deaths*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2815-23.
127. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
128. Varga, Z., et al., *Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death*. Immunobiology, 2021. **226**(1): p. 152032.
129. Fekete, T., et al., *Interferon gamma boosts the nucleotide oligomerization domain 2-mediated signaling pathway in human dendritic cells in an X-linked inhibitor of apoptosis protein and mammalian target of rapamycin-dependent manner*. Cell Mol Immunol, 2017. **14**(4): p. 380-391.
130. Molnar, T., et al., *Caspase-9 acts as a regulator of necroptotic cell death*. FEBS J, 2021. **288**(22): p. 6476-6491.
131. Huang, Z., et al., *RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(2): p. 229-42.
132. Zhang, D.W., et al., *RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis*. Science, 2009. **325**(5938): p. 332-6.
133. Zhao, X.M., et al., *Hsp90 modulates the stability of MLKL and is required for TNF-induced necroptosis*. Cell Death Dis, 2016. **7**(2): p. e2089.
134. He, S., et al., *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. Cell, 2009. **137**(6): p. 1100-11.
135. Wu, J., et al., *Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis*. Cell Res, 2013. **23**(8): p. 994-1006.
136. Varga, Z., et al., *Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis*. Cancer Immunol Immunother, 2020. **69**(11): p. 2193-2207.
137. Raggi, F., et al., *Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1097.
138. Benner, B., et al., *Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 140.
139. Elliott, L.A., et al., *Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 86.
140. Gordon, S.R., et al., *PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity*. Nature, 2017. **545**(7655): p. 495-499.
141. Jenei, V., et al., *Comparison of the immunomodulatory potential of platinum-based anti-cancer drugs and anthracyclins on human monocyte-derived cells*. Cancer Chemother Pharmacol, 2023. **91**(1): p. 53-66.
142. Liston, D.R. and M. Davis, *Clinically Relevant Concentrations of Anticancer Drugs: A Guide for Nonclinical Studies*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(14): p. 3489-3498.
143. Bracci, L., et al., *Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 15-25.
144. Sanchez, L.R., et al., *The emerging roles of macrophages in cancer metastasis and response to chemotherapy*. J Leukoc Biol, 2019. **106**(2): p. 259-274.
145. Jin, J., et al., *CCL2: An Important Mediator Between Tumor Cells and Host Cells in Tumor Microenvironment*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 722916.

146. Aldinucci, D., C. Borghese, and N. Casagrande, *The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression*. Cancers (Basel), 2020. **12**(7).
147. Nozaki, K., L. Li, and E.A. Miao, *Innate Sensors Trigger Regulated Cell Death to Combat Intracellular Infection*. Annu Rev Immunol, 2022. **40**: p. 469-498.
148. Lodes, M.J., et al., *Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1296-306.
149. Geng, D., et al., *TLR5 Ligand-Secreting T Cells Reshape the Tumor Microenvironment and Enhance Antitumor Activity*. Cancer Res, 2015. **75**(10): p. 1959-1971.
150. Schram, B.R., et al., *B cell receptor basal signaling regulates antigen-induced Ig light chain rearrangements*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4728-41.
151. Nemazee, D., *Mechanisms of central tolerance for B cells*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(5): p. 281-294.
152. Limnander, A., et al., *STIM1, PKC-delta and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development*. Nat Immunol, 2011. **12**(5): p. 425-33.
153. Imamura, Y., et al., *BLNK binds active H-Ras to promote B cell receptor-mediated capping and ERK activation*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9804-13.
154. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. **190**(11): p. 1697-710.
155. Smith, S.H. and M.P. Cancro, *Cutting edge: B cell receptor signals regulate BlyS receptor levels in mature B cells and their immediate progenitors*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 5820-3.
156. Van Opdenbosch, N. and M. Lamkanfi, *Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease*. Immunity, 2019. **50**(6): p. 1352-1364.
157. Chakrabandhu, K., et al., *An Evolution-Guided Analysis Reveals a Multi-Signaling Regulation of Fas by Tyrosine Phosphorylation and its Implication in Human Cancers*. PLoS Biol, 2016. **14**(3): p. e1002401.
158. Krammer, P.H., R. Arnold, and I.N. Lavrik, *Life and death in peripheral T cells*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(7): p. 532-42.
159. Davidson, W.F., et al., *T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6218-30.
160. Bertheloot, D., E. Latz, and B.S. Franklin, *Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death*. Cell Mol Immunol, 2021. **18**(5): p. 1106-1121.
161. Brown, G.C., *Cell death by phagocytosis*. Nat Rev Immunol, 2023.
162. Totzke, J., et al., *TAK1: a potent tumour necrosis factor inhibitor for the treatment of inflammatory diseases*. Open Biol, 2020. **10**(9): p. 200099.
163. Santoro, R., et al., *TAK-ing aim at chemoresistance: The emerging role of MAP3K7 as a target for cancer therapy*. Drug Resist Updat, 2017. **33-35**: p. 36-42.
164. Ding, L., et al., *Aurora kinase a regulates m1 macrophage polarization and plays a role in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Inflammation, 2015. **38**(2): p. 800-11.
165. Kapralov, A.A., et al., *Redox lipid reprogramming commands susceptibility of macrophages and microglia to ferroptotic death*. Nat Chem Biol, 2020. **16**(3): p. 278-290.
166. Hao, Q., et al., *Enhanced RIPK3 kinase activity-dependent lytic cell death in M1 but not M2 macrophages*. Mol Immunol, 2021. **129**: p. 86-93.
167. Ali, H., et al., *Selective killing of human M1 macrophages by Smac mimetics alone and M2 macrophages by Smac mimetics and caspase inhibition*. J Leukoc Biol, 2021. **110**(4): p. 693-710.
168. Garris, C.S. and J.J. Luke, *Dendritic Cells, the T-cell-inflamed Tumor Microenvironment, and Immunotherapy Treatment Response*. Clin Cancer Res, 2020. **26**(15): p. 3901-3907.
169. Burai, S., et al., *Comprehensive analysis of different tumor cell-line produced soluble mediators on the differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells*. PLoS One, 2022. **17**(10): p. e0274056.