

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Az NLRP3 inflammaszóma-mediált IL-1 β termelés
összehasonlító vizsgálata különböző típusú humán,
monocita eredetű makrofágokban**

Budai Marietta Margit

Témavezető: Dr. Benkő Szilvia



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2017

Az NLRP3 inflammaszóma-mediált IL-1 β termelés összehasonlító vizsgálata különböző típusú humán, monocita eredetű makrofágokban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Budai Marietta Margit
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Benkő Szilvia, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok:

Prof. Dr. Bajtay Zsuzsanna, az MTA doktora

Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, 3.009-010

2017. június 20. 11:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

Dr. Dénes Ádám, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

tagok:

Prof. Dr. Bajtay Zsuzsanna, az MTA doktora

Prof. Dr. Nagy Péter, az MTA doktora

Prof. Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

Dr. Dénes Ádám, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme

2017. június 20. 13:00 óra

Bevezetés

Az IL-1 β egy „karmester” citokin, mely számos fiziológiai és immunológiai folyamatot szabályoz. Központi szerepének köszönhetően aktív formájának szekréciója szigorúan szabályozott az ún. inflammaszóma multiprotein komplex által. Az NLRP3 inflammaszóma az egyik leginkább tanulmányozott inflammaszómák közé tartozik, mely az NLRP3 szenzorból, az ASC adaptorból és a kaszpáz-1 enzimből áll. Irodalmi adatok szerint az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásához két külön szignál szükséges. Az első, ún. „priming” szignál leginkább a Toll-like receptorok által, több jelátviteli útvonal aktiválásával indukálja a pro-IL-1 β és az inflammaszóma (NLRP3) tagok expresszióját. A második szignál az inflammaszóma komplex összeépülésén keresztül a kaszpáz-1 enzim aktiválódásához vezet, mely az inaktív pro-IL-1 β -t aktív citokinné hasítja. A második szignált számos patogén-asszociált molekuláris mintázat (PAMP) és veszély-asszociált molekuláris mintázat (DAMP) biztosíthatja.

Az NLRP3 inflammaszóma funkcióinak tanulmányozására modellként leggyakrabban humán makrofágokat alkalmaznak. A makrofágok képlékeny sejtek, melyek különböző morfológiai és funkcionális tulajdonságok alapján csoportosíthatóak. A humán monocitából történő differenciálódásuk nagymértékben függ a mikrokörnyezet stimulusaitól és a makrofág kolóniastimuláló faktor (M-CSF) vagy a granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) jelenlététől. A makrofágok az immunválasz kialakulásának erős indukáló és szabályozó sejtjei. Ezek az immunsejtek nemcsak a fertőzés vagy sérülés által kiváltott gyulladás kialakulásában, hanem a gyulladásos folyamatok leállításában, a sebgyógyulásban és a szöveti regenerációban is központi szerepet játszanak.

Célunk egy összehasonlító tanulmány elkészítése volt, mely az NLRP3 inflammaszóma aktiválódás dinamikai és molekuláris mechanizmusait vizsgálja humán monocita eredetű, M-CSF jelenlétében (M-MF) vagy GM-CSF jelenlétében (GM-MF) differenciálódott makrofágokban LPS kezelést követően. Továbbá munkánk során megvizsgáltuk a természetes eredetű, immunmoduláló *Aloe Vera* hatását is a makrofágokra, amit a hagyományos orvoslásban elsősorban a fertőzések, a gyulladás és a sebgyógyulásban alkalmaznak.

2. Irodalmi háttér

2.1. Veszély- és patogén asszociált molekuláris mintázatok

A természetes immunrendszer sejtjei képezik az elsődleges védelmi vonalat a patogén organizmusokkal szemben, melyeket a patogén-asszociált molekuláris mintázatok (PAMP) által a mintázatfelismerő receptorok ismernek fel. Ugyanakkor a saját eredetű molekulák vagy exogén, nem fertőző anyagok, ún. veszély- (vagy károsodás) asszociált molekuláris mintázatok (DAMP) is képesek aktiválni a természetes immunsejteket. A PPR receptorok aktiválódása többek között citokinek termelődéséhez vezet, mely mind a patogének által kiváltott mind pedig steril gyulladás kialakulását indukálhatja.

2.2. Nod-like receptorok

Az Nod-like receptorokat tipikus hármas domén szerkezet jellemzi. Az N-terminális fehérje-fehérje interakcióban szerepet játszó domén, a központi elhelyezkedésű NACHT domén (vagy NBD – nukleotidot kötő domén), mely az oligomerizációért felelős és a C-terminális leucinban gazdag szekvencia (LRR), mely a ligandot ismeri fel. Az NLR fehérjék specifikus PAMP és DAMP mintázatokat érzékelnek. Emberben eddig 22 NLR tagot azonosítottak, melyeket az N-terminális domének alapján 5 alcsaládba sorolhatunk: NLRA, NLRB, NLRC, NLRX és NLRP. A legjobban karakterizált funkcióik alapján további 3 alcsoportot különíthetünk el. Egyes tagok inflammaszóma képzésre képesek, így nélkülözhetetlen szerepet játszanak az IL-1 β és IL-18 pro-inflammatórikus citokinek érésében. Egy másik alcsoport tagjai képesek a szignál útvonalakat pozitív vagy negatív módon szabályozni. Érdekes módon, a harmadik alcsoport a reprodukcióban és az embrionális fejlődésben játszik fontos szerepet, mely bizonyítja, hogy az NLR-ek nem csak az immunfolyamatok szabályozásában vesznek részt.

2.2.1. Inflammaszómák

Az inflammaszómákat először a Tschopp munkacsoport írta le 2002-ben, mint egy NLR szenzor, ASC adaptor és kaszpáz-1 cisztein proteázból felépülő fehérjekomplexet. Habár a fehérjekomplex az aktivátorok széles skáláját képes felismerni, a különböző inflammaszómák azonos effektor funkciót látnak el. A stimulációt követően a tagok oligomerizálódnak, ami a kaszpáz-1 enzim aktiválódásához vezet, mely elsődleges szerepe a pro-inflammatórikus IL-1 β és az IL-18 citokinek hasítása.

A kaszpáz-1 prekursor formában szintetizálódik, majd a pro-kaspáz-1 auto-proteolitikus hasítások révén aktiválódik, mely a nagy (p20) és a kis (p10) alegységek felszabadulásához vezet. Az inflammaszóma ilyen módon történő, hagyományos aktiválódása mellett létezik egy alternatív aktiválódási folyamat is. Ebben az esetben a kaszpáz-1 enzim helyett a kaszpáz-11 (egérben) vagy a kaszpáz-4 és -5 (emberben) játszik szerepet.

A gyulladásos és immunfolyamatokban betöltött nélkülözhetetlen szerepe miatt az IL-1 β egy fontos regulátor citokin. Az IL-1 β nemcsak más gyulladásos citokinek és kemokinek termelődését szabályozza, de indukálja az endotél sejtek felszínén az adhézións molekulák expresszióját is, mely az immunsejtek fokozott infiltrációját eredményezi. Mindezek mellett az IL-1 β vazodilatációt okoz, valamint hozzájárul a fájdalom, a láz kialakulásához is, így joggal vált a helyi és szisztémás gyulladás egyik legfőbb résztvevőjévé, mely számos betegség kialakulásához vezethet.

2.3. NLRP3 inflammaszóma

Az NLRP3-at 2002-ben PYPAF1 vagy Cryopyrin néven írták le és mára az NLR család leginkább tanulmányozott tagjává vált. Az NLRP3 inflammaszóma működésének zavara súlyos gyulladásos megbetegedésekhez vezet, ami a kontrollálatlan IL-1 β termelés következménye. A betegségek egyik csoportját képezik az ún. Cryopyrinopátiák nevű autoimmun betegségek, melyek számos szövetre, köztük az ízületekre és a bőrre kiterjedő, visszatérő szisztémás gyulladással jellemezhetők. Továbbá az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása fontos szerepet játszik bizonyos fehérjeszerkezeti betegségek (pl.: Prion betegségek, Alzheimer-kór, Parkinson-kór), metabolikus zavarok (pl.: 2-es típusú diabetesz), bizonyos foglalkozásokkal összefüggő megbetegedések (pl.: szilikózis, asbesztózis) és különböző allergiás betegségek patogenezisében is.

Az IL-1 β központi szerepének köszönhetően az NLRP3 inflammaszóma aktiválódása egy szigorúan szabályozott, két szignált igénylő folyamat, mely transzkripciós szinten és poszt-transzkripciós szinten egyaránt kontrollált. Az első szignál az ún. „priming” tipikusan PAMP-ok által aktivált Toll-like receptorokon keresztül valósul meg. Ez a folyamat szükséges a pro-IL-1 β és az inflammaszóma tagok expressziójához számos jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül (JNK, ERK, p38 MAPK és NF- κ B). A második szignál az inflammaszóma komplex összeépüléséhez vezet, mely során aktív IL-1 β citokin szekretálódik a sejtéből. Ezt a szignált számos mikroba eredetű (PAMP) és veszély (DAMP) molekula

beindíthatja. Ma már általánosan elfogadott, hogy az NLRP3 inflammaszóma-mediált IL-1 β szekréció akár patogén hiányában is bekövetkezhet, ún. steril gyulladások során.

Mivel a molekulák széles tárháza képes aktiválni az NLRP3 inflammaszómát, feltételezhetjük, hogy ezeket nem közvetlenül érzékeli az NLRP3, mely felveti egy általános molekuláris mechanizmus szerepét. Számos elmélet született arra, hogy az NLRP3 aktiváció milyen mechanizmusokon keresztül történhet. Ilyenek például az intracelluláris K⁺ szint csökkenés (K⁺ „efflux”); az mtROS vagy mtDNS felszabadulás vagy a lizoszómális katepszinek felszabadulása.

2.3.1. K⁺ „efflux”, mint NLRP3 inflammaszóma aktivátor

Az NLRP3 inflammaszóma egyik fő aktivátoraként az intracelluláris K⁺ szint csökkenést azonosították, mely aktiválja a kaszpáz-1 enzimet. A K⁺ „efflux” mind a mikrobiális toxin, a nigericin, mind pedig az extracelluláris ATP hatására kialakulhat. A gyulladás és a szöveti károsodás nagy mennyiségű ATP felszabaduláshoz vezethet, mely a P2X7 receptoron keresztül, mint „veszély szignál” aktiválja az NLRP3 inflammaszómát. Az extracelluláris ATP koncentrációja ektonukleotidázok által szabályozott. A CD39 az ATP-t hidrolizálja AMP-vé, amit a CD73 bont tovább adenozinná. Az adenozin négy transzmembrán receptort képes aktiválni (A1, A2a, A2b és A3), mely számos fiziológiai folyamatot szabályoz.

2.3.2. ROS, mint NLRP3 inflammaszóma aktivátor

A legtöbb celluláris ROS (Reactive Oxygen Species) a mitokondriumokból szabadul fel. Kimutatták, hogy az aktiváció során az NLRP3 a mitokondriumok közelében lokalizálódik, mely arra engedett következtetni, hogy érzékelheti a felszabaduló ROS-t. Az utóbbi években pedig számos tanulmány bizonyította, hogy az mtROS megkötése gátolja az NLRP3 inflammaszóma működését. Mindemellett kutatások azt is kimutatták, hogy megnövekedett intracelluláris ROS esetén, az oxidatív stressz mediátor, a TXNIP (thioredoxin-interacting protein) fehérje képes az NLRP3-hoz kötődni, mely az inflammaszóma aktiválódásához vezet.

2.3.3. Mitokondrium károsodás, mint NLRP3 inflammaszóma aktivátor

Az mtROS mellett a károsodott mitokondriumból felszabaduló oxidált mitokondriális DNS (mtDNS) is képes az NLRP3 inflammaszómát aktiválni. A legfrissebb kutatások szerint

a károsodott mitokondriumok intracelluláris felhalmozódása, ezáltal az mtDNS fokozott felszabadulása a citoplazmába a hibásan működő autofágia mechanizmusának a következménye, mely az NLRP3 inflammaszóma hiperaktivációját is okozza.

2.3.4. A lizoszómális destabilizáció, mint NLRP3 inflammaszóma aktivátor

Az antigénprezentáló sejtek által fagocitált steril szemcsék vagy kristályok a lizoszóma membránjának károsodását idézik elő, ezáltal lehetőséget teremtve a lizoszómális proteázok, többek között a katepszin B felszabadulására, melyről kimutatták, hogy szerepet játszhat az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásában. Ugyanakkor a lizoszóma károsodása az intracelluláris Ca^{2+} szint növekedését is eredményezi, mely feltételezések szerint kulcs szereplője lehet az NLRP3 inflammaszóma funkciójának.

2.3.5. Az NLRP3 inflammaszóma intracelluláris lokalizációja

A sejt nyugalmi állapotában a legtöbb NLRP3 fehérjét a citoplazmában homogénen elhelyezkedve, az endoplazmatikus retikulumhoz (ER) asszociáltan mutatták ki. Az inflammaszóma aktivációja során az NLRP3 a sejtmag köré lokalizálódik és az ER-hoz és a mitokondrium-asszociált ER membránhoz társul. A legújabb kutatások azt is kimutatták, hogy az NLRP3 képes a MAVS (mitochondrial antiviral signaling) fehérjével kapcsolódni, mely az oligomerizációját indukálja, ezáltal a kaszpáz-1 enzim aktivációját okozza.

2.4. TLR4, a lipopoliszacharid receptora

A Toll-like receptorok kulcsfontosságú szerepet játszanak a természetes immunitás aktiválódásában. Beutler munkacsoportja fedezte fel, hogy a TLR4 receptor a lipopoliszacharid (LPS) érzékelésére képes, mely a Gram-negatív baktérium jellegzetes membránkomponense. Számos tanulmány bizonyítja, hogy humán makrofágokban az LPS stimulációt követően több jelátviteli útvonal is aktiválódik, többek között az NF- κ B, az ERK 1/2, JNK és a p38 MAPK, következésképpen a transzkripciós faktorok megannyi gyulladásos mediátor átíródását szabályozzák.

2.5. Makrofágok

A makrofágok az immunválasz kialakulásának erős indukáló és szabályozó sejtjei. A csontvelőben található hematopoetikus őssejtekből származnak, melyek a véráramba kerülve

monocitává, majd a különböző szövetekbe vándorolva makrofággá differenciálódnak, mely nemcsak fertőzés esetén, de normál körülmények között is végbemegy. A makrofágok fejlődése és polarizációja nagymértékben függ a specifikus mikrokörnyezettől, ebből következik, hogy a sejtek meglehetősen képlékenyek és az egyes populációk más és más morfológiával valamint funkcióval rendelkezhetnek. Az idő során számos protokoll alakult ki a makrofágok rendszerének *in vitro* körülmények között történő vizsgálatára. Kísérleti egerekben a makrofágok mind a peritoneumból mind pedig az alveoláris „lavage”-ből izolálhatóak, illetve a csontvelőből M-CSF jelenlétében differenciáltathatók. Ezzel szemben a humán rendszerben a makrofágok differenciációja perifériás vérből izolált monocitákból történik M-CSF (M-MF) vagy GM-CSF (GM-MF) jelenlétében.

2.5.1. M-CSF jelenlétében differenciálódott makrofágok (M-MF)

TLR aktivációt követően az M-MF-on végzett vizsgálatok kimutatták a pro-inflammatórikus citokinek, mint az IL-1 és IL-8 alacsony szintű, ugyanakkor az anti-inflammatórikus cikokinek, mint az IL-10 expressziójának fokozott expresszióját. Az IL-10 gátolja az aktivált makrofágok és dendritikus sejtek funkcióit, ennek köszönhetően fontos szerepet játszik a természetes immunreakciók szabályozásában. Mivel az IL-10-et ezek a sejtek is képesek termelni, ezáltal a sejt saját funkcióit is kontrollálja egyfajta negatív visszacsatolásként. Irodalmi adatok alapján az M-CSF által differenciálódott makrofágok legfőbb tulajdonságai a szöveti regenerációban és az immunfolyamatok szabályozásában van.

2.5.2. GM-CSF jelenlétében differenciálódott makrofágok (GM-MF)

A GM-MF-ok fokozott inflammatórikus tulajdonsággal rendelkeznek, ugyanis a gyulladásos citokinek, mint az IL-1 β , IL-6, TNF α , és kemokinek, mint a CCL22, CCL24, CCL5 és CCL1 expressziója fokozott mértéket mutat. Továbbá a GM-MF-ok nagymértékben fejeznek ki CD86 és CD80 kostimulációs, valamint a HLA-DR molekulákat, ami egyúttal az antigén prezentálásban játszott fontos szerepükre is utal.

Mindazonáltal fontos megjegyezni, hogy a GM-CSF kezelés az egér csontvelői eredetű sejtek esetében a dendritikus sejtek kialakulását indukálja, mialatt a makrofágok differenciálódásához rendszerint M-CSF kezelést alkalmaznak. Ezzel szemben humán monocitákból GM-CSF és IL-4 közös kezelés következtében differenciálódik dendritikus sejt. A humán makrofágok funkcióinak tanulmányozására pedig a monocitákból M-CSF és GM-CSF jelenlétében differenciálódott sejteket használják. Azonban ez a két faktor eltérő

tulajdonságú makrofágok kialakulását eredményezi, ugyanis az M-CSF egy anti-inflammatórikus, ezzel szemben a GM-CSF egy pro-inflammatórikus makrofág populációt generál.

2.6. *Aloe vera*, egy természetes, immunmoduláló szer

A gyulladásos megbetegedések legfőbb kezelési stratégiája régóta a szintetikus gyulladást gátló gyógyszerek alkalmazásán alapszik. Ugyanakkor manapság egyre inkább nő az érdeklődés az alternatív, természetes orvosságok iránt, mely kisebb kockázattal okoznak mellékhatásokat.

Az *Aloe* növények közül csak pár fajta rendelkezik kereskedelmi jelentőséggel, melyek közül az *Aloe barbadensis miller*, az általánosan csak *Aloe vera*-nak nevezett növény a leghatékonyabb. Az *Aloe vera* gyógyászati alkalmazása több mint 2000 évre nyúlik vissza és többek között Kínában, Indiában és Japánban volt közkeletű. A levél gél állományában több mint 75 aktív komponenst azonosítottak eddig és számos közülük rendelkezik immunmoduláló tulajdonsággal.

Az *Aloe vera*-t általában külsőleg, különböző bőrbetegségekre, sérülésekre alkalmazták, mint vágások, égési sérülések és az ekcéma kezelése. Az *Aloe* gél sebgyógyulásra gyakorolt jótékony hatásának hátterében számos mechanizmust azonosítottak, mint például a sebszélek összehúzása, az epitel sejtek migrációjának indukálása, a kollagén szintézis fokozása és a gyulladás csökkentése.

Kutatások szerint az *Aloe vera* gél anti-inflammatórikus tulajdonsága a különböző gyulladásos citokinek (pl.: TNF α , IL-1 β , IL-6) gátlásán keresztül valósul meg. Néhány összetevő, mint a poliszacharidok vagy az antrakinon származék, az emodin azonban képesek a makrofágokat és az NK sejteket aktiválni. A gyulladást gátló hatása mellett az *Aloe vera* rendelkezik mikrobaölő, antioxidáns, tumor ellenes és antidiabetikus hatással is..

Mindazonáltal az *Aloe vera* olcsó és könnyen hozzáférhető, alkalmazása egyszerű, mely tulajdonságok alkalmassá teszik egy széleskörű terápiás felhasználásra a jövőben.

2.7. Célkitűzések

Cél 1. Az NLRP3 inflammaszóma-mediált IL-1 β termelés vizsgálata humán GM- és M-makrofágokban

Habár az NLRP3 inflammaszóma az egyik leginkább tanulmányozott inflammaszóma komplex, eddig nem készült összehasonlító vizsgálat, mely a különböző módon differenciáltatott (M-CSF vagy GM-CSF) humán makrofágok LPS-indukált, NLRP3 inflammaszóma-mediált IL-1 β szekrécióját vizsgálná. Annak ellenére, hogy a makrofágok egy képlékeny, különböző morfológiával és funkcióval jellemezhető heterogén populációt képeznek a szervezetben, a korábbi tanulmányok leginkább az általános génexpressziós különbségekre és néhány funkcióbeli eltérésre fókuszáltak. Annak érdekében, hogy jobban megértsük az NLRP3 inflammaszóma szabályozását a különböző humán makrofágokban, célul tűztük ki:

- az LPS-aktivált M- és GM-makrofágok időfüggő citokin termelésének vizsgálatát.
- az NLRP3 inflammaszóma-függő kaszpáz-1 enzim szerepének feltérképezését az LPS-indukált IL-1 β termelésben mindkét makrofág típus esetében.
- a jelátviteli útvonalak és az inflammaszóma komponensek expressziójának vizsgálatát mindkét makrofág típusban
- a felszabaduló endogén ATP és az adenozin hatásának vizsgálatát az IL-1 β termelésben
- az M-MF által termelt nagy mennyiségű IL-10 citokin szerepének meghatározását a sejt IL-1 β termelésében.

Cél 2. Az immunmoduláló *Aloe vera* hatásának vizsgálata a humán makrofágok LPS-indukált gyulladásos citokin termelésére és az NLRP3 inflammaszóma expressziójára

Habár több tanulmány foglalkozik az *Aloe vera* antioxidáns, mikrobaölő és anti-inflammatórikus tulajdonságaival, szerepét a pro-inflammatórikus IL-1 β termelődésben eddig még nem határozták meg. Ezért célul tűztük ki az *Aloe vera* hatásának vizsgálatát:

- a humán makrofágok által termelt citokinek szekréciójára.
- az NLRP3 inflammaszóma tagok, valamint a pro-IL-1 β expressziójára.
- a legfontosabb LPS-indukált jelátviteli útvonalak aktivációjára.
- az ATP szenzor P2X7 receptor expressziójára.

3. Metodikák

Reagensek

Escherichia coli-ből származó ultrapure LPS az InvivoGen cégtől (San Diego, CA, USA), az ATP, az A740003 (szelektív P2X7 purinoceptor antagonist), az ARL67156 (ekto-ATPáz inhibitor), az apiráz (nagy aktivitású), a ZM241385 (A2a-specifikus antagonist), a PSB1115 (A2b-specifikus antagonist), a DPCPX (A1-specifikus antagonist) és a VUF5574 (A3-specifikus antagonist) a Sigma-Aldrich cégtől (St. Louis, MO, USA) származnak. A Z-YVAD-FMK (kaspáz-1 inhibitor) a BioVision Technologies cégtől (Milpitas, CA, USA) lett megvásárolva. Az Anti-humán IL-10 a Thermo Fisher Scientific cégtől (San Diego, CA, USA) a rekombináns humán IL-10 pedig a PeproTech-től (Rocky Hill, NJ, USA) lett beszerezve.

A kereskedelmi forgalomban kapható *Aloe vera* gélt (Forever Living Products Hungary Ltd) 2000 rpm sebességgel 30 percen át centrifugáltuk, majd a tiszta felülúszót használtuk a kísérleteinkhez. Továbbá minden alkalommal alkalmaztunk megfelelő oldószer kontrollt is.

THP-1 sejtek tenyésztése és makrofágokká történő differenciáltatása

A THP-1 humán monocita eredetű sejteket (ATCC TIB-202) 2mM L-glutamin tartalmú RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tápoldatban tenyésztettük 10% hőinaktivált FCS és 500 U/ml penicillin-sztreptomycin (Thermo Fisher Scientific) mellett. A THP-1 sejteket 0.5 μ M phorbol myristate acetate (Invivogen) jelenlétében 3 órán keresztül differenciáltattuk, majd 3x mostuk PBS-ben és $1,3 \times 10^6$ /ml sűrűségben tenyésztőedényekbe tettük. 24 óra elteltével a sejteket 100 ng/ml LPS-sel kezeltük *Aloe vera* jelenlétében vagy hiányában.

Monocita izolálás és makrofág differenciáció

A humán vérkészítményeket (buffy coat) a Regionális Vérellátó Központ bocsátotta rendelkezésünkre az Országos Vérellátó szolgálat igazgatójának, valamint a Regionális és a Debreceni Egyetem Szervezet Kutatásetikai Bizottságának jóváhagyásával. Minden vérvétel a donorok előzetes informálásával és beleegyezésével történt. A mononukleáris sejteket Ficoll Paque PLUS sűrűséggradiens alapján izoláltuk, majd a CD14⁺ monocitákat anti-CD14 konjugált mikrogöngyök (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) segítségével különítettük el. A monocitákat 24-lyukú tenyésztőedényekbe, 2mM L-glutamin tartalmú és

10% hőinaktivált FCS-sel és 500 U/ml penicillin-sztreptomycin antibiotikummal kiegészített RPMI 1640 tápoldatba helyeztük. A makrofágok differenciációja 5 napon keresztül 50 ng/ml M-CSF (PeproTech) vagy 80 ng/ml GM-CSF (Gentaur Molecular Products, Kampenhout, Belgium) jelenlétében történt. A 2. napon az M-CSF-et és a GM-CSF-et újrapióltuk. A differenciáció 5. napján a makrofágokat (M-MF, GM-MF) adott időtartamig LPS-sel (500 ng/ml) stimuláltuk. Az aktivációs idő leteltével a sejtek begyűjtését megelőzően ATP (5mM) kezelést végeztünk 45 percen keresztül. Néhány kísérletben az izolálást követően CD14⁺ monocitákat kezeltünk LPS-sel.

Életképességi teszt

A monocitákat 96-lyukú sejtenyésző edényekbe helyeztük 2×10^5 db/lyuk sűrűségben. A differenciáció 5. napján a makrofágokat (M-MF, GM-MF) LPS-sel aktiváltuk az adott időintervallumig. A kezelést követően a sejtek felülszóját 100 µl MTT-t [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] tartalmazó PBS-re (0,5 mg/ml) cseréltük. A sejteket ezután 2-4 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk, majd a formazán kristályokat 100 µl szolubilizáló oldat (81 v/v% isopropanol, 9 v/v% 1M HCl, 10 v/v% TritonX-100) hozzáadásával oldottuk fel. A színintenzitást FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) segítségével 550 nm-en mértük. A kísérleteket minden esetben három technikai ismétléssel végeztük.

ATP koncentráció meghatározás

A makrofágok felülszóját begyűjtöttük, lecentrifugáltuk és a sejtmentes felülszóból az „ATPlite” lumineszcens kit (PerkinElmer, Budapest, Hungary) segítségével határoztuk meg az ATP koncentrációját a gyártó cég leírásának megfelelően. A lumineszcens jelet a Wallac 1420 Victor2 fluorimeter-luminometer (Wallac Oy, Turku, Finland) készülékkel detektáltuk.

ELISA

A begyűjtött felülszókat lecentrifugáltuk, majd a további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az IL-6, TNF α , IL-10 és IL-8 citokineket az ATP kezelés előtt gyűjtött felülszókból detektáltuk. Az IL-1 β citokin koncentrációját az ATP-vel kezelt és kezeletlen sejtek felülszójából is meghatároztuk ELISA módszerrel. A módszer kivitelezése a gyártó cég által meghatározott leírások alapján történt (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) és a mérést a FlexStation 3 Microplate Reader készülékkel végeztük. A detektálási határ az egyes citokinek

esetében az alábbiak: az IL-1 β és az IL-8 esetében 0.8 pg/ml, az IL-10 és a TNF α esetében 2 pg/ml az, valamint 2.2 pg/ml az IL-6 esetében.

RNS izolálás és RT-PCR

A sejtekből TriReagens (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA) segítségével izoláltunk RNS-t a gyártó által leírt instrukciók alapján. Az RNS koncentrációját spektrofotométerrel (NanoDrop ND1000; Promega Biosciences, Madison, WI, USA) határoztuk meg. Az adott mennyiségű RNS-t DNáz enzimmel (Ambion, Austin, TX, USA) kezeltük, majd a reverz transzkripciót SuperScript II Reverz Transzkriptázzal és oligo dT primerekkel (Thermo Fisher Scientific) végeztük.

Valós idejű kvantitatív PCR (qPCR)

A mintákból a PCR mérést az ABI Step One Plus készülék (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük. Az amplifikációs reakciókhoz „TaqMan” primereket és próbákat (Thermo Fisher Scientific), Taq DNS Polimerázt (Fermentas, Vilnius, Lithuania) és Rox referencia festéket (Thermo Fisher Scientific) használtunk. A génexpresszió relatív mennyiségét a Δ CT módszer segítségével határoztuk meg és ciklofilin háztartási génekre normalizáltuk.

Western Blot analízis

A sejteket begyűjtöttük és lecentrifugáltuk. A felülúszóból a fehérjéket 20%-os triklórecetsavval (TCA) precipitáltuk, majd a pellet acetonos mosását követően a mintákat beszárítottuk és „loading” pufferben vettük fel (62,5 mM Tris-HCl, pH 8.8, 25 % glicerol, 2 % SDS, 1 % β -merkaptotanol és 1 % brómfenolkék). A sejteket ugyancsak „loading” pufferben lizáltuk. A mintafelvétel előtt minden mintát 10 percig 100°C-on inkubáltunk. A fehérjéket SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét és nitrocellulóz membránra transzferáltuk. Ezt követően a membránokat 1 órán keresztül 5%-os sovány tejport tartalmazó Tween-TBS-ben blokkoltuk. A membránokat ezután elsődleges ellenanyagokkal jelöltük egy éjszakán át 4°C-on: pro-IL-1 β , procaspase-1, Akt1 és ASC (Santa Cruz Biotechnology), hasított IL-1 β (p17) és hasított caspase-1 (p20) (Cell Signaling Technology), NLRP3 (AdipoGen), P2X7R (Alomone labs), p-Akt (S473) (R&D systems), p-ERK1/2 (Sigma-Aldrich), p-I κ B α , I κ B α , ERK1/2, p-SAPK/JNK, SAPK/JNK, p-p38 és p38 MAPK (Cell Signaling Technology). Másnap az elsődleges antitestnek megfelelő HRP-

konjugált, másodlagos antitesttel (Bio-Rad Laboratories) inkubáltuk a membránokat 1 órán át szobahőmérsékleten. A fehérjéket Supersignal West-Pico peroxide/luminol kit (Pierce Biotechnology) segítségével tettük láthatóvá. A különböző minták egyenlő fehérje mennyiségét a β -aktin (Sigma-Aldrich) expressziójának kimutatásával határoztuk meg.

Kaspáz-1 enzimaktivitás mérés

A kaspáz-1 aktivitását a sejtek lizátumából határoztuk meg acetilált, AMC-konjugált fluorimetrikus peptid szubsztrát Acetyl-Tyr-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methyl-coumarin (AnaSpec) segítségével. A sejteket lízispufferben 30 percig inkubáltuk jégen (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 % Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 0.5 μ g/ml pepstatin, 1.25 μ g/ml leupeptin and 1 mM DTT). Centrifugálást (10 000 g, 10 min at 4 °C) követően 30 μ g fehérje lizátum felülúszóját 100 μ l lízis pufferben 40 μ M szubsztráttal (végső koncentráció) inkubáltuk szobahőmérsékleten „mikrotiter plate” –en. Az AMC felszabadulásából származó fluoreszcencia növekedést 460 nm-en detektáltuk, 355 nm excitációs hullámhossz mellett (Wallac 1420 Victor2 fluorimeter-luminometer).

siRNA transzfekció

A differenciáció 3. napján a sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, a sejteket PBS-es mosást követően OptiMEM oldatban (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) vettük fel. A sejteket NLRP3 specifikus siRNS vagy negatív kontroll siRNS (Ambion) jelenlétében elektroporáltuk (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad). Végül a sejteket (1×10^6 cells / ml) 24-lyukú szövettenyésztő edénybe helyeztük vissza és az 5. napon a makrofágokat (M-MF, GM-MF) LPS-sel kezeltük (500 ng/ml).

Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéseink során a szignifikáns különbség megállapításához Student-féle *t*-próbát végeztünk. Az adatokat a számtani közép (mean) standard deviáció \pm SD alapján prezentáljuk. A többszörös összehasonlításokhoz egyfaktoros ANOVA analízist végeztünk post-hoc (Bonferroni) módszer kiegészítéssel.

4. Eredmények

4.1. Az NLRP3 inflammaszóma-mediált IL-1 β termelés vizsgálata GM-CSF és M-CSF által differenciáltatott humán makrofágokban.

4.1.1. Az LPS kezelés az M- és a GM-makrofágok eltérő citokintermelését okozza

Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét makrofág típus termel TNF α és IL-8 citokineket, de eltérő időkinetikával és mennyiségben. Mialatt az M-MF mérsékelt TNF α szekréción mutat 6 órás csúcsponttal az LPS kezelést követően, a GM-MF a 24 órás kezelés alatt fokozatosan növekvő mennyiségben termel TNF α citokint. Az IL-8 termelés mindkét makrofágban folyamatosan növekvő tendenciát mutatott. Az IL-6-ot nehezen tudtuk detektálni az LPS-aktivált M-MF-ok felülúszójából, ellenben a GM-MF-ok bőségesen szekretálták a citokint. Ezzel szemben megfigyeléseink szerint az LPS kezelés az M-makrofágokban indukálta az IL-10 termelést, mialatt a GM-makrofágok esetében nem detektáltunk IL-10 felszabadulást.

Mivel számos kutatócsoport kimutatta, hogy a makrofágok IL-1 β termeléséhez szükség van ATP kezelésre, mind az ATP kezelt és kezeletlen sejtekről begyűjtöttük a felülúszókat. Meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy ATP kezelést követően az M-MF nagy mennyiségben szekretált IL-1 β -át az LPS kezelés után 2 órával, aminek a szintje gyorsan csökkent idővel. Ezzel szemben a GM-MF folyamatosan növekvő mennyiségben szabadított fel IL-1 β -át, mely legnagyobb detektált koncentrációja összehasonlítható volt az M-MF-ok maximumával. Ahogy vártuk, ATP hiányában az LPS-aktivált M-MF-ok nem termeltek IL-1 β citokint. Meglepetésünkre azonban az LPS-aktivált GM-MF-ok ugyan mérsékelt módon, de szignifikáns IL-1 β mennyiséget szekretáltak ATP kezelés nélkül is.

4.1.2. Az LPS-indukált IL-1 β termelés mindkét makrofágban kaspáz-1 függő, NLRP3 inflammaszóma-mediált útvonalon történik

A kaspáz-1 szerepének vizsgálatához specifikus inhibitor jelenlétében figyeltük az LPS-aktivált makrofágok IL-1 β termelését. Eredményeink szerint a Z-YVAD-FMK inhibitor szignifikáns módon csökkentette a makrofágok IL-1 β szekréción ATP jelenlétében. Továbbá kimutattuk, hogy ATP hiányában az LPS-aktivált GM-makrofágoknál tapasztalt IL-1 β felszabadulás is a kaspáz-1 enzim működésének köszönhető.

Korábbi tanulmányok szerint a csökkent intracelluláris K⁺ szint az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásához vezet. Hogy tisztázzuk, melyik inflammaszóma játszik

szerepet az LPS-indukált IL-1 β termelésben, a makrofágokat KCl-ot magas koncentrációban tartalmazó tápoldatban inkubáltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy a K⁺ efflux gátlásával mindkét makrofág típus IL-1 β termelődése gátolt. Az NLRP3 inflammaszóma szerepét erősíti az NLRP3 csendesítés eredménye is, ahol szintén csökkent IL-1 β termelődést detektáltunk.

4.1.3. A GM-makrofágok által felszabadított ATP nem befolyásolja közvetlenül az NLRP3 inflammaszóma aktivációt

Irodalmi adatok alapján a monociták képesek LPS kezelés hatására IL-1 β -t szekretálni, mely a felszabadult endogén ATP parakrin vagy autokrin hatásának bizonyult, ami az NLRP3 inflammaszóma aktivációjához vezetett. Ezzel szemben az irodalom szerint az LPS-aktivált makrofágok hasonló körülmények között nem szekretálnak IL-1 β -t, mivel nem képesek ATP felszabadításra. Amikor megvizsgáltuk a makrofágok felülűszóinak ATP tartalmát, érdekes módon már a kezelt GM-makrofágoknál detektáltunk ATP felszabadulást, mely szignifikánsan magasabb volt az M-MF-hoz képest. Mindazonáltal az LPS kezelés csökkentette a GM-MF felülűszójában az ATP koncentrációját 24 óra elteltével.

Az extracelluláris ATP a P2X7 receptoron keresztül aktiválja az NLRP3 inflammaszómát. Mindkét makrofág esetében az LPS kezelés indukálta a receptor expresszióját, mely idővel az LPS-aktivált M-MF-nál nagyobb mértékű csökkenést mutatott. A receptor specifikus inhibitorának alkalmazása teljes mértékben gátolta az ATP-indukált IL-1 β termelődést az LPS-aktivált makrofágokban. Ugyanakkor a P2X7 receptor gátlása és az ATP-t hidrolizáló apiráz használata sem csökkentette az IL-1 β szekrécióját az LPS-aktivált GM-makrofágoknál hozzáadott ATP hiányában. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az LPS-indukált IL-1 β termelés a GM-makrofágokban P2X7 receptor független mechanizmus.

4.1.4. A CD39 és CD73 ektonukleotidázok működése hozzájárul a GM-MF-ok IL-1 β szekréciójához

A CD39 és a CD73 működése meghatározza az extracelluláris környezetben felhalmozódó ATP mennyiségét, ezért a következőkben ezen ektonukleotidázok expresszióját vizsgáltuk a makrofágokban. Eredményeink szerint az LPS kezelés az M-MF-nál nagyobb mértékben indukálta a CD39 expresszióját a GM-MF-hoz képest. Ezzel szemben a CD73 kifejeződése az LPS-aktivált GM-MF esetében volt jelentősebb és az M-MF csak kismértékű expressziót mutatott.

Hogy megvizsgáljuk az ektonukleotidázok hatását a felszabaduló endogén ATP katabolizmusára és a GM-makrofágok IL-1 β termelésére, a sejteket specifikus inhibitorral (ARL67156) kezeltük, mely az IL-1 β szekréció csökkenését okozta. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a GM-MF-ban nem a felszabaduló endogén ATP, hanem az ATP hidrolíziséből származó mellék- vagy végtermékek okozhatják az IL-1 β szekréciót.

4.1.5. Az adenzin fokozza az LPS-aktivált GM-MF IL-1 β termelését

Az adenzin szerepének tisztázására először a négy adenzin receptor expresszióját vizsgáltuk meg LPS-aktivált M- és GM-makrofágokban. Eredményeink szerint az A2b és A3 receptorok expressziója erősen indukálódott, de a hosszabb LPS inkubáció mindkét receptor szintjének csökkenését idézte elő a makrofágokban. Eközben az A2a esetében az expresszió szignifikáns növekedését követően csak kismértékű csökkenést tapasztaltunk a GM-MF-ban, ellenben az M-MF-ban ugyancsak drámai módon redukálódott az A2a szintje. A legtöbb időpontban mind az A2a mind pedig az A2b receptor kifejeződése erőteljesebb volt a GM-MF-ban az M-MF-hoz képest. Érdekes módon egyik makrofágban sem tudtuk detektálni az A1 receptort.

A következő kísérletekben adenzin receptorok specifikus antagonistájával kezeltük az LPS-aktivált makrofágokat és azt kaptuk, hogy az A2a és A2b antagonisták csökkentették az IL-1 β termelődést, mialatt az A1 és az A3 specifikus antagonisták nem okoztak szignifikáns változást. Továbbá a GM-makrofágok növekvő mennyiségű adenzinnal történő kezelése fokozta az LPS-indukált IL-1 β szekréciót. Hasonló eredményeket kaptunk ATP jelenlétében is. Érdekes módon az adenzin nem befolyásolta az LPS-aktivált M-MF-ok IL-1 β szekrécióját ATP jelenlétében sem. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy az adenzin fontos szabályzó szerepet játszik a GM-MF-ok IL-1 β szekréciójában függetlenül az ATP kezeléstől, viszont az M-MF-ok IL-1 β szekréciójára nincs hatással.

4.1.6. Az NLRP3 és a pro-IL-1 β expressziójának, valamint a kaspáz-1 enzim által mediált IL-1 β szekréció vizsgálata GM- és M-makrofágokban

Hogy kiderítsük, milyen molekuláris folyamatok állhatnak még a két makrofág típus között tapasztalt eltérő IL-1 β szekréció hátterében, megvizsgáltuk az LPS aktivált NF- κ B és MAPK jelátviteli útvonalakat. Eredményeink szerint az ERK1/2 útvonal már a kezeletlen M-MF-ban aktiválódik és a foszforilált fehérje mennyisége LPS kezelés hatására fokozódott 30 percig. A GM-MF-ban az LPS 30 percnél indukálta az ERK1/2 foszforilációját, ami hamar leregulálódott. A p38 és a SAPK/JNK aktivációjában hasonló időkinetikát fedeztünk fel a két

makrofág típus között, habár az M-MF-ban egy intenzívebb foszforilációt tapasztaltunk. Érdekes módon az I κ B α foszforilációja LPS hatására a GM-MF-ban már 10 perces kezelésnél megtörtént, mialatt az M-MF-ban az NF- κ B útvonal csak később aktiválódott (60 perc).

Ezen kívül szignifikáns különbségeket detektáltunk az NLRP3 szenzor molekula és a pro-IL-1 β expressziójában is. Az NLRP3 fehérje már a kezeletlen M-MF-ban is jól kimutatható volt, amit az LPS kezelés tovább fokozott és az expresszió 2 óra múlva érte el a csúcspontot, ezek után hamar lecsökkent a fehérjemennyiség. Ezzel szemben a kezeletlen GM-MF-ban alig volt detektálható az NLRP3, de az LPS kezelés erősen indukálta az expresszióját, ami 24 órán keresztül folyamatosan nőtt. Eredményeink szerint a pro-IL-1 β termeléshez szükség van az LPS aktivációra mindkét makrofágban. Az LPS erősen indukálja a pro-IL-1 β -át, azonban a korai expressziót követően az M-MF-ban folyamatosan és gyorsan csökken, ellenben a GM-MF-ban folyamatosan nő a fehérje mennyisége.

Mind a sejtek lizátumából, mind pedig a felülúszóból intenzív kaspáz-1 fehérje expressziót tudtunk kimutatni az M-MF-ban 2 órás LPS kezelést követően, ami 12 órára szinte teljesen eltűnt. A GM-MF esetében az aktív formája a kaspáz-1 enzimnek csak nehezen volt kimutatható, habár fokozatosan indukálódott az LPS kezelésre. Meghatároztuk a kaspáz-1 enzim aktivitását is, mely ATP hiányában az LPS-aktivált M-MF-ban alig volt mérhető, mindazonáltal az ATP kezelés erősen fokozta 2 óráig. Meglepő módon az enzimaktivitást ATP hiányában is ki tudtuk mutatni az LPS-aktivált GM-MF-ban, de hasonló eredményt kaptunk LPS kezelés nélkül is. Ráadásul az ATP fokozta a kaspáz enzim aktivitását.

4.1.7. Az M-MF IL-1 β termelésének gyors csökkenését a nagy mennyiségű IL-10 szekréció okozza

ELISA eredményeink azt mutatják, hogy az M-MF az időfüggő LPS kezelés alatt erősen növekvő mennyiségben termel IL-10-et, ezzel párhuzamosan viszont csökken az IL-1 β szekréciója. Hogy meghatározzuk az IL-10 szerepét az IL-1 β szint gyors csökkenésében, rhIL-10 citokinnel kezeltük az M-MF-ot. A kezelés az IL-1 β termelés gátlását okozta, ezzel szemben a neutralizáló ellenanyag (IL-10NE) hatására fokozott IL-1 β szekréciót mértünk.

Az egyik legfontosabb útvonal, melyre az IL-10 hatással van, az Akt jelátviteli útvonal, amit az IL-10 receptorához kötődve gátolni képes. Eredményeink szerint az Akt szignifikánsan gyengébb foszforilációt mutat az LPS-aktivált M-MF-ban, mint a GM-MF-ban. Mikor az LPS-aktivált M-MF-ot rhIL-10 kezelésnek tettük ki, az Akt foszforilációjában

csökkenést tapasztaltunk az LPS kezeléshez képest, ami arra utal, hogy az IL-10 valóban gátolja ezt az útvonalat az M-MF-ban.

4.2. Az *Aloe vera* csökkenti az LPS-indukált gyulladásos citokinek termelődését és az NLRP3 inflammaszóma expresszióját humán makrofágokban.

Az *Aloe vera* anti-inflammatórikus tulajdonságát több gyulladásos modellben kimutatták, ami részben a gyulladásos citokinek, mint például az IL-1 β szintjének csökkentésével valósul meg. Azonban a molekuláris mechanizmust, mely az IL-1 β csökkenés hátterében állhatnak, eddig még senki nem tanulmányozta.

4.2.1. A GM-MF-ok sokkal érzékenyebbek az *Aloe* kezelésre, mint a THP-1 makrofágok

Először meghatároztuk az *Aloe vera* humán makrofágok életképességére gyakorolt hatását. Eredményeink azt mutatják, hogy a 10 v/v % koncentrációban alkalmazott *Aloe vera* sem befolyásolta szignifikánsan a THP-1 sejtek életképességét. Azonban érdekes módon a GM-MF-ok esetében már az 5 v/v % -os *Aloe vera* kezelés is a sejtek 50%-nak pusztulását okozta, a 10 v/v % koncentráció pedig több mint a sejtek 70%-át pusztította el.

4.2.2. Az *Aloe vera* szignifikánsan csökkenti az LPS-aktivált makrofágok citokintermelését

Eredményeink alapján az *Aloe vera* kezelés önmagában nem befolyásolja szignifikáns mértékben sem a THP-1 sejtek sem a primer makrofágok pro-inflammatórikus citokintermelését. Mindazonáltal az *Aloe vera* koncentrációfüggő módon, nagymértékben csökkentette az LPS-indukált IL-8, TNF α , IL-6 és IL-1 β szekrécióját mindkét sejttypusban. Továbbá a GM-MF-ok esetében az *Aloe vera* (3 v/v %) kezelés a citokintermelés több mint 70 %-os csökkenését okozta, mialatt a THP-1 sejtekben a legnagyobb koncentráció (10 v/v %) alkalmazása mellett sem értünk el ilyen hatásfokot.

4.2.3. Az *Aloe vera* csökkenti az LPS-indukált IL-1 β expresszióját

Kísérleteink során a GM-MF-ot az *Aloe vera* 3 v/v %-os koncentrációjával kezeltük önmagában vagy LPS-aktivációt követően. Western blottal kimutattuk, hogy az *Aloe vera* kezelés szignifikánsan csökkenti mind a pro-IL-1 β , mind pedig a hasított IL-1 β fehérje

expresszióját LPS-aktivált GM-MF-ban. Továbbá az *Aloe vera* az LPS-indukált pro-IL-1 β expresszióját transzkripció szinten is képes volt csökkenteni koncentrációfüggő módon.

4.2.4. Az *Aloe vera* csökkenti az LPS-indukált NLRP3 és kaspáz-1 expresszióját GM-MF-ban

Hogy megvizsgáljuk az *Aloe vera* hatását az NLRP3 inflammaszóma komponensekre, a GM-makrofágokat LPS-sel aktiváltuk *Aloe vera* jelenlétében vagy hiányában majd az NLRP3 és a kaspáz-1 enzim fehérjék expresszióját detektáltuk. Eredményeink szerint az *Aloe vera* kezelés önmagában nem befolyásolta a vizsgált inflammaszóma tagok kifejeződését sem mRNS sem pedig fehérje szinten, azonban az LPS-indukált expressziót nagymértékben csökkentette.

4.2.5. Az *Aloe vera* csökkenti az LPS-indukált P2X7 receptor expresszióját

Ahogy már korábban megállapítottuk az LPS-aktivált GM-MF-ok ATP-indukált IL-1 β termelésében nélkülözhetetlen a P2X7 receptor. Ezért megvizsgáltuk, hogy az *Aloe vera* befolyásolja-e az expresszióját eme ATP szenzor receptornak. Eredményeink szerint a P2X7 receptor kifejeződését szinte teljes mértékben gátolja az *Aloe vera* az LPS-aktivált GM-makrofágokban. Ezen eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a P2X7 receptor készlet kimerítése is hozzájárul az IL-1 β termelés csökkenéséhez továbbá az *Aloe vera* széleskörű reguláló hatását is bizonyítja.

4.2.6. Az *Aloe vera* gátolja az LPS-indukált NF- κ B, p38, JNK és ERK jelátviteli útvonalakat

Ahhoz, hogy kiderítsük milyen hatással van az *Aloe vera* kezelés a jelátviteli útvonalak aktivációjára, a makrofágokat időfüggő módon LPS-sel kezeltük *Aloe vera* jelenlétében vagy hiányában. Ahogy azt korábban is megállapítottuk, az NF- κ B útvonal erősen aktiválódik az LPS-stimulált GM-MF-ban és érdekes módon az I κ B α foszforilációját teljes mértékben gátolja az *Aloe vera*. Továbbá az LPS-indukált p38, ERK 1/2 és SAPK/JNK foszforilációját is meggátolta az *Aloe vera* kezelés. Következésképpen kijelenthetjük, hogy az *Aloe vera* kezelés a jelátviteli útvonalak széles spektrumát képes gátolni, mely hozzájárul az anti-inflammatorikus és egyben IL-1 β -át gátló hatásához.

5. Diszkusszió

Az IL-1 β egy kulcsfontosságú citokin, mely számos immunológiai és fiziológias folyamat szabályzásában részt vesz. Fontos szerepének köszönhetően az IL-1 β szekréciója szigorúan ellenőrzött folyamat, mely az NLRP3 inflammaszóma-mediált kaspáz-1 enzim működését igényli. Sok sejttípus képes IL-1 β citokint termelni, mint például a makrofágok, melyek a természetes immunrendszer képlékeny sejtpopulációját alkotják. Számos protokoll született a különböző típusú makrofágok *in vitro* körülmények közötti tanulmányozására. Ezért célul tűztük ki egy összehasonlító tanulmány elkészítését, mely az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásának molekuláris mechanizmusait és dinamikáját vizsgálja eltérő makrofág típusokban. Munkánk során az általánosan elfogadott M-CSF vagy GM-CSF jelenlétében differenciálódott M-, illetve GM-MF-ok LPS-indukált IL-1 β szekrécióját tanulmányoztuk ATP hatására, mely egy fonton DAMP molekula az NLRP3 inflammaszóma aktiválásban.

Először feltérképeztük a makrofágok citokin profilját és eredményeink azt mutatják, hogy a GM-MF-ok fokozott gyulladásos citokintermeléssel válaszolnak az LPS stimulusra, ezzel szemben az M-MF-ok nagy mennyiségben szekretáltak IL-10 anti-inflammatórikus citokint. Eredményeink így alátámasztják az általános tudományos véleményt, miszerint a humán monocitából GM-CSF jelenlétében differenciálódott makrofág pro-inflammatórikus tulajdonságokkal rendelkezik, mely a gyulladás kialakulását segíti. Ezzel szemben az M-CSF kezelés egy anti-inflammatórikus jellemzőket hordozó makrofág populációt eredményez, mely inkább a szöveti regenerációban és sebgyógyulásban játszhat fontos szerepet.

Érdekes módon azonban kimutattuk, hogy ATP kezelés hatására mindkét LPS-aktivált makrofág típus termel IL-1 β citokint közel azonos mennyiségben, habár nagyon különböző időkinetikával. Mialatt az M-MF az LPS kezelést követően gyorsan képes nagymennyiségű IL-1 β -t szekretálni, de csak rövid ideig, addig a GM-MF az idő függvényében folyamatosan növekvő mennyiségben termeli a citokint. Az NLRP3 inflammaszóma aktivációhoz két szignál együttes hatása szükséges. Az ún. „priming” szignál az alegységek expresszióját indukálja, mialatt a második szignál, mint az ATP az inflammaszóma tagok összeépüléséhez és aktiválódásához vezet. Az irodalom szerint a makrofágok IL-1 β termeléséhez mindkét szignál elengedhetetlen. Ahogy azt vártuk, a második szignál hiányában nem detektáltunk IL-1 β -t az LPS-aktivált M-MF-ok felülírójában. Azonban érdekes módon hasonló körülmények között a GM-MF szekretált IL-1 β citokint, a monocitákkal azonos mennyiségben.

Az ATP gyulladás vagy szöveti károsodás következtében kerülhet ki az extracelluláris térbe. Korábbi tanulmányok szerint azonban a mikrobiális komponensekkel stimulált humán monociták ATP-t szabadítanak fel, mely autokrin / parakrin módon felelős a P2X7 receptor-mediált NLRP3 inflammaszóma aktiválódásért, ezáltal az IL-1 β szekrécióért. Eredményeink azt mutatják, hogy mindkét makrofágból szabadul fel ATP nanomólos koncentrációban, habár a GM-MF felülúszójában szignifikánsan többet detektáltunk az M-MF-hoz képest. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a vizsgált makrofágok közel azonos mértékben expresszálnak funkcionális P2X7 receptort. Mindazonáltal a receptor inhibitor nem befolyásolta a GM-MF IL-1 β szekrécióját LPS kezelés során, továbbá az apiráz kezelés sem csökkentette a citokintermelést. Ezen eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a GM-MF-ok LPS-indukált IL-1 β termelése a felszabaduló endogén ATP-től független folyamat. Továbbá a megfigyeléseink és a hasonló irodalmi eredmények arra engednek következtetni, hogy az ATP-t érzékelő P2X7 receptor alacsony szenzitivitása az M- és a GM-MF-ok aktiválódását a gyulladásokra és a sejtkárosodásokra korlátozza, amikor az ATP milimólos koncentrációban szabadul fel az immunsejtekből vagy a sejt halála során.

Az ATP extracelluláris térbe kerülését követően a CD39 AMP-vé, majd a CD73 adenzinná defoszforilálja ezáltal szabályozva az immunitást és a gyulladást. Eredményeink szerint mindkét makrofág expresszál CD39 és CD73 ektoenzimet LPS kezelést követően, de különböző mértékben. Kimutattuk, hogy az M-MF-ban az LPS-indukált CD39 kifejeződése szignifikánsan nagyobb mértékű volt a GM-MF-hoz képest. Ezzel szemben a CD73, mely az adenzin extracelluláris felhalmozódását indukálja, a GM-MF-ban expresszáldott jobban. Mivel ezek a makrofág típusok különböző mértékben expresszálják az ekto-nukleotidázokat azt a következtetést vontuk le, hogy az ATP hidrolíziséből származó mellék- vagy végtermékeknek, mint az adenzinnak fontos szabályozó szerepe lehet a GM-MF-ok IL-1 β termelésére. Ezt a feltevésünket azok az eredményeink is alátámasztották, miszerint az ekto-nukleotidázok gátlása során szignifikáns csökkenést mértünk az LPS-indukált IL-1 β termelésben a GM-MF-nál, mialatt az extracelluláris ATP szint nőtt.

Az adenzin a szakirodalom szerint az IL-1 β termelés egyik fontos regulátora és eredményeink azt mutatják, hogy ATP kezelés hiányában az adenzin koncentrációfüggő módon fokozza az LPS-indukált IL-1 β szekréciót a GM-MF-ban. Továbbá azt is kimutattuk, hogy az LPS-aktivált GM-MF-ok IL-1 β termelését az A2a vagy az A2b receptorok gátlása csökkentette, mely receptorok expressziója a GM-MF-ban szignifikánsan több mint az M-MF-ban. Az A2a és az A2b receptorok aktiválása stimulálja a ciklikus AMP átalakulást, mely

szabályozza a nem-szelektív kation csatornák működését, melyek a kalcium és a kálium homeosztázisért felelősek, ami fontos regulátora az NLRP3 inflammaszóma aktivációnak is.

Továbbá kimutattuk, hogy az adenozin fokozza a GM-MFok LPS-indukált IL-1 β szekrécióját ATP jelenlétében, mialatt az M-MF-ok esetében nem figyeltünk meg hasonló jelenséget. Ezek az eredmények jól mutatják, hogy az adenozin receptorok sejtfelszíni eloszlása nagy jelentőséggel bír a gyulladás szabályozásában.

Mivel eddig többféle inflammaszóma komplexet azonosítottak, mely az IL-1 β termelést szabályozza, megvizsgáltuk, hogy a két makrofág típus IL-1 β szekréciójában az NLRP3 inflammaszóma játszik-e szerepet. Kaszpáz-1 enzim specifikus gátlásával, illetve az NLRP3 csendesítéssel bizonyítottuk, hogy az M- és a GM-MF-ok IL-1 β termelése az általános kaszpáz-1 enzim-függő módon, az NLRP3 inflammaszóma aktiválódásához kötött folyamat.

Összehasonlítottuk az inflammaszóma tagok LPS-indukált expresszióját a két sejttípusban és az NLRP3, illetve a pro-IL-1 β dinamikájában érdekes különbségeket tapasztaltunk a két makrofág között. Az M-MF-ban az LPS kezelés az említett fehérjék expresszióját rövid időn belül indukálta, ami hamar gyors csökkenéshez vezetett. Ezzel szemben a GM-MF-ban a fehérjeszint lassan, de folyamatosan növekedet az LPS kezelés hatására. Továbbá azt is kimutattuk, hogy a pro-IL-1 β megjelenéséhez feltétlenül szükséges volt a „priming” stimulushoz mindkét makrofágban, viszont az NLRP3-at a kezeletlen M-MF-ban is képesek voltunk detektálni. A makrofágok fehérje termelésében észlelt különbségek mögött eltérő molekuláris mechanizmusokat sejtettünk, ezért megvizsgáltunk különböző jelátviteli útvonalakat is. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az M-MF-nál detektált korai eseményeket a MAPK útvonalak gyors és erőteljes aktivációja okozza LPS kezelést követően. Továbbá kimutattuk, hogy az ERK útvonal már a kezeletlen M-MF-ban is aktív, ami alapján feltételeztük, hogy ez az alapszintű folyamatos aktivitás az M-MF-ok „fél-aktivációs” állapotát eredményezheti és így az NLRP3 fehérje folyamatos jelenlétét, ami a GM-MF esetében csak LPS kezelés hatására indukálódik.

Ugyancsak megvizsgáltuk a két makrofág IL-1 β szekréciójához nélkülözhetetlen kaszpáz-1 enzim működését is, hogy fényt derítsünk az NLRP3 inflammaszóma aktivációjában detektált különbség okára. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a „priming” stimulus mellett, mely nélkülözhetetlen mindkét makrofág számára a proIL-1 β *de novo* szintéziséhez, valamint az NLRP3 indukciójához, a második szignál, mint az ATP szintúgy alapvető az M-MF kaszpáz-1 enzim aktiválódásához. Ezzel szemben a GM-MF

esetében az ATP kezelés hiányában detektált IL-1 β termelés a folyamatosan aktív kaszpáz-1 enzimnek köszönhető.

Továbbá az M-MF-ban kimutattunk egy érdekes összefüggést az LPS által indukált, fokozódó IL-10 szekréció és a párhuzamosan csökkenő tendenciát mutató IL-1 β felszabadulás között. Az M-MF-ban az IL-10 citokin neutralizálása során növekvő, mialatt a rekombináns humán IL-10 citokin alkalmazásával csökkent IL-1 β szekréciót mértünk. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy az IL-10 citokinnek fontos szerepe van az M-MF anti-inflammatórikus tulajdonságainak kialakításában. Eredményeink arra is rámutattak, hogy az LPS kezelést követően az M-MF-ban az Akt jelátviteli útvonal aktiválódása csökkent mértéket mutatott a GM-MF-hoz képest. Több kutatócsoport is kimutatta, hogy az IL-10 gátolja az Akt foszforilációját, ami más útvonalak aktiválódásában is csökkenést eredményez. Ezek az eredmények magyarázhatják az LPS-aktivált M-MF-ok esetében tapasztalt korai gátlást a JNK és ERK foszforilációban. Mivel ezek az útvonalak fontos regulátorai az NLRP3 inflammaszóma „priming”-nak, az M-MF-ban az NLRP3 és a pro-IL-1 β expresszióban észlelt gyors csökkenés és ennek következtében a gátolt IL-1 β szekréció legalább részben az IL-10 közvetett gátlásával magyarázható.

Eredményeink nagymértékben hozzájárulhatnak a makrofágokról alkotott általános ismeretünkhöz, melyek különböző fenotípussal rendelkező heterogén populációt alkotnak így segítve az állandóan változó környezeti hatások által indukált hatékony immunválasz kialakulását. A gyulladásos mediátorok magas szintű termelése súlyos krónikus gyulladásos megbetegedések, mint a reumatoid arthritis, diabétesz vagy tumor kialakulásához vezethet, melyek patogenezise szorosan kapcsolódik a makrofágok abnormális aktivációjával. Éppen ezért a makrofágok IL-1 β termelésének jobb megértése nagy előnyt jelent a klinikai immunológiának egy új lehetséges célpont felderítésében.

Az *Aloe vera* sebgyógyulásban kifejtett jótékony hatását évszázadok óta ismerik és több kultúrában előszeretettel alkalmazták. Ráadásul az aktív összetevőknek számos más jótékony hatását is leírták, mint az anti-diabetikus, tumorelleses vagy antimikrobiális hatásokat. Az *Aloe vera* anti-inflammatórikus hatását az elmúlt évtizedekben intenzíven tanulmányozták, habára a háttérben álló molekuláris mechanizmusokra csak az elmúlt pár évben kezd fény derülni. Munkánk során a korábbi kísérleteinkben jól meghatározott GM-MF-ok és a humán makrofág-szerű THP-1 sejtvonal IL-1 β termelésére kifejtett hatását vizsgáltuk az *Aloe vera* gélnek. Eredményeink szerint az *Aloe vera* kezelés koncentrációfüggő módon, szignifikánsan csökkenti a THP-1 és a GM-MF-ok LPS-indukált IL-8, TNF α , IL-6 és IL-1 β termelését. Ezek az eredmények összhangban állnak azon állatkísérletek

eredményeivel, amiben az *Aloe vera* anti-inflammatórikus hatását a differenciálatlan THP-1 sejtek IL-1 β és TNF α termelésén vizsgálták, habár a molekuláris mechanizmust magyarázatára nem terjedt ki a kutatás. Továbbá életképességi teszttel kimutattuk, hogy a primer GM-MF-ok sokkal érzékenyebbek az *Aloe* kezelésre, mint a THP-1 sejtek, ugyanakkor az anti-inflammatórikus hatás is erősebbnek bizonyult ezeken a sejteken. Azért hogy a kísérleteink az *in vivo* állapotot jobban tükrözzék, a továbbiakban a primer sejteken vizsgáltuk az *Aloe* hatását a makrofágok IL-1 β termelésére. Eredményeink azt mutatják, hogy az LPS-indukált kaszpáz-1 és NLRP3 expresszió szignifikáns módon csökkent mind mRNS mind fehérje szinten az *Aloe vera* kezelés hatására. Ezen kívül kimutattuk az *Aloe vera* gátló hatását az LPS-indukált pro-IL-1 β expresszióra, ami mint elsődleges szubsztrátként egyúttal az inflammaszóma komplex működését is korlátozza. Ahogy azt korábban bizonyítottuk az LPS-aktivált GM-MF-ok ATP indukció által bekövetkezett IL-1 β termelése P2X7 receptor függő folyamat. Ennek megfelelően megvizsgáltuk az *Aloe vera* hatását a P2X7 receptor expressziójára. Az *Aloe* kezelés teljes mértékben gátolta az LPS-indukált megjelenését az ATP-szenzor receptornak.

Továbbá kísérleteink során azt is bizonyítottuk, hogy az *Aloe vera* képes gátolni az LPS szignalizációban szerepet játszó valamennyi útvonalat. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az *Aloe vera* a GM-MF-ok IL-1 β termelését az NLRP3 inflammaszóma szintjén felül, a „priming” szignálnál képes gátolni. Mindazonáltal az ATP-szenzor P2X7 receptor expressziójában észlelt változás is hozzájárulhat az IL-1 β látványos gátlásához, mely arra enged következtetni, hogy az *Aloe vera* több szinten fejti ki anti-inflammatórikus hatását. Ezáltal az *Aloe vera* hatékony új terápiás eszköz lehet az NLRP3 inflammaszóma-mediált citokin termelés gátlásában.

Eredményeink segíthetnek tisztázni néhány az NLRP3 inflammaszóma szakirodalomban fellelhető ellentmondásos adatot, valamint az inflammaszóma szabályozással kapcsolatos eltérések okait, melyek a módszer, a sejttípus vagy faji különbségekből erednek.

6. Összefoglalás

A makrofágok fenotípusainak és funkcióinak *in vivo* kialakulása nagymértékben függ az összetett és folyamatosan változó mikrokörnyezetben található molekuláris és sejtes tényezőktől. Humán rendszerben, *in vitro* körülmények között, a perifériás vérből származó monocitákból leggyakrabban M-CSF (M-MF) vagy GM-CSF (GM-MF) jelenlétében történik a makrofágok differenciálása. A szakirodalomból ismert, hogy a GM-CSF kezelés során a monocitából nagy baktériumölő képességgel rendelkező makrofág keletkezik, mely nagy mennyiségben termel gyulladásos mediátorokat. Ezzel szemben az M-CSF kezelés hatására keletkező makrofágokra nem jellemző a gyulladásos citokinek termelése és leginkább a sebgyógyulásban és a szöveti regenerációban játszanak fontos szerepet.

Összehasonlítva a két LPS-aktivált MF típus citokin termelését, azt tapasztaltuk, hogy a GM-MF sokkal intenzívebben termelte a TNF α , IL-6 és IL-8 citokineket, az M-MF-hoz képest. Ugyanakkor csak az M-MF esetében mértünk IL-10 anti-inflammatórikus citokin felszabadulást. Érdekes módon további eredményeink azt mutatták, hogy a második szignál, az ATP jelenlétében mindkét LPS-aktivált MF képes volt hasonló mennyiségben IL-1 β citokint termelni, habár eltérő módon. Az M-MF rövid idejű LPS kezelés hatására szekretálta az IL-1 β -t, aminek a szintje a hosszabb LPS kezelés során gyorsan lecsökkent. Ez a jelenség részben a felszabaduló IL-10 hatásának volt köszönhető, ami gátolta az Akt jelátviteli útvonalat. Ezzel szemben a GM-MF IL-1 β termelése folyamatosan nőtt az LPS aktiválás során ATP jelenlétében. Érdekes módon ezek a sejtek ATP kezelés nélkül is képesek voltak IL-1 β szekrécióna, melyben a folyamatosan aktív kaszpáz-1 enzim játszott fontos szerepet. Kimutattuk, hogy az LPS-indukált IL-1 β termelést a GM-MF által felszabadított endogén ATP nem befolyásolta közvetlenül és P2X7 receptor független módon valósult meg. A pillanatnyi extracelluláris ATP koncentrációt a felszabaduló ATP mennyisége és a membránköthött ekto-nukleotidázok ATP bontása határozza meg. Eredményeink azt mutatták, hogy a két makrofág típus eltérő mértékben expresszálta a CD39 és a CD73 ekto-nukleotidázokat, melyek a GM-MF-ok IL-1 β termelésében fontos regulátornak bizonyultak. Továbbá azt is kimutattuk, hogy az adenzin, az ekto-nukleotidázok működése során keletkező egyik végtermék, fokozza az LPS-indukált IL-1 β szekrécióna a GM-MF-ban, ezzel szemben az M-MF-nál ilyen jellegű hatást nem tapasztaltuk. Eredményeink azt mutatják, hogy az M- és a GM- makrofágok különböző stimulusokra adott eltérő válaszát az NLRP3 inflammaszóma expressziójában és aktivációs állapotában, valamint a jelátviteli útvonalak aktivációjában tapasztalt különbségek okozzák.

Az anti-inflammatorikus *Aloe Vera* humán makrofágok IL-1 β termelésére gyakorolt hatásának vizsgálatát a GM- makrofágokon végeztük, melyek gyulladásos tulajdonságait mi is bizonyítottuk. Kimutattuk, hogy az *Aloe vera* által erősen gátolt IL-1 β szekréciót mind a pro-IL-1 β mind pedig az NLRP3 inflammaszóma komponensek expressziójában bekövetkezett csökkenés eredményezte, mely specifikus útvonalak gátlásán keresztül valósult meg. Továbbá eredményeink szerint az *Aloe vera* az ATP szenzor P2X7 receptor kifejeződését is gátolta, mely nagymértékben hozzájárult az IL-1 β szint csökkenéséhez.

Az intenzív kutatások eredményeként általános ismeretünk az NLRP3 inflammaszóma funkciójáról és szabályozásáról gyorsan bővül. Úgy véljük, hogy eredményeink segítenek az NLRP3 inflammaszómaival kapcsolatos ellentmondások egy részét megérteni. Továbbá hozzájárulnak annak megértéséhez is, hogy az inflammaszóma aktiváció és az IL-1 β termelődés nagymértékben a sejtípus tulajdonságaitól többek között különböző intracelluláris és extracelluláris szabályzó molekuláktól függ. Mindazonáltal, eredményeink egy új terápiás megközelítés lehetőségét kínálhatja, mely hatékonyabb IL-1 β szabályozást nyújthat szisztémás vagy krónikus betegségekben.

7. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/73/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Budai Marietta Margit

Neptun kód: RYGTX2

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Budai, M. M.**, Tózsér, J., Benkő, S.: Different dynamics of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1[béta] production in GM-CSF- and M-CSF-differentiated human macrophages.
J. Leukoc. Biol. [Epub ahead of print], 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.3A0716-300RR>
IF: 4.165 (2015)
2. **Budai, M. M.**, Varga, A., Milesz, S., Tózsér, J., Benkő, S.: Aloe vera downregulates LPS-induced inflammatory cytokine production and expression of NLRP3 inflammasome in human macrophages.
Mol. Immunol. 56 (4), 471-479, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.005>
IF: 3.003





További közlemények

3. Varga, A., **Budai, M. M.**, Milesz, S., Bácsi, A., Tőzsér, J., Benkő, S.: Ragweed pollen extract intensifies LPS-induced priming of NLRP3 inflammasome in human macrophages. *Immunology*. 138 (4), 392-401, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/imm.12052>
IF: 3.735

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,903

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,168

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.03.29.



Szóbeli prezentációk

Budai MM.: Immunomodulatory effect of *aloe vera* extract on human macrophages, 5th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2012. január 4-7., Galyatető

Budai MM.: Possible molecular differences in the mechanisms of IL-1 β production by human monocyte-derived different macrophages, 6th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, 2013. január 8-11., Galyatető

Budai MM., Varga A., Benkő S. : Lipopolysaccharide induces IL-1 β production via P2X7 receptor – independent mechanisms in human GM-MFs, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, 2014. augusztus 24-27., Debrecen

Budai MM., Becsei A., Varga A., Tőzsér J., Benkő S. : Molecular mechanisms of IL-1 β production and NLRP3 inflammasome function in LPS-activated human macrophage subtypes, Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, 2014. augusztus 24-27., Debrecen

Poszter prezentációk

Budai MM., Varga A., Tőzsér J., Benkő S.: Az NLRP3 inflammoszóma által közvetített IL-1 β termelés vizsgálata különböző módon differenciáltatott makrofágokban LPS kezelést követően, A Magyar Élettani Társaság Kongresszusa, 2012. június 10-13, Debrecen

Budai MM., Varga A., Danis J., Tőzsér J., Benkő S. : NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production by LPS in different phenotypes of macrophages, European Macrophage and Dendritic Cell Society Meeting, 2012. szeptember 1-3., Debrecen

Budai MM. Danis J., Varga A., Csernoch L., Tőzsér J., Benkő S. : Molecular differences in the mechanisms of NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production by LPS-activated human monocyte-derived macrophage subpopulations, 8th ENII –Summer School, 2013. május 27-június 3., Szardínia, Olaszország

Budai MM., Danis J., Varga A., Varga D., Csernoch L., Tőzsér J., Benkő S. : Az LPS-aktivált humán makrofágok NLRP3 inflammoszóma mediált IL-1 β termelésének hátterében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata, A Magyar Élettani Társaság Kongresszusa, 2013. június 5-8., Budapest.

Budai MM., Danis J., Varga A., Csernoch L., Tőzsér J., Benkő S. : NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β production by LPS in different phenotypes of human macrophages, A Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése, 2013. október, Pécs

Budai MM., Varga A., Csernoch L., Benkő S. : The lipopolysaccharide-induced NLRP3-dependent IL-1 β production by GM-MFs is independent of the purinergic P2X7 receptor, 44th Annual Meeting of the German Society for Immunology, 2014. szeptember 17-20., Bonn, Németország

8. Tárgyszavak

Nod-like receptorok, NLRP3 inflammaszóma, IL-1 β citokin, makrofágok, P2X7 receptor, ATP, adenzin, jelátvitel, *Aloe vera*

9. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Benkő Szilviának, aki bevezetett a tudományos élet mindennapjaiba és hasznos tanácsaival, folyamatos támogatásával segítette szakmai fejlődésemet és bátorított a PhD éveim alatt.

Szeretnék köszönetet mondani Tőzsér József professzor úrnak az értékes javaslatokért és konstruktív tanácsokért, valamint a tudományos publikációimban való részvételért.

Köszönettel tartozom Csernoch László professzor úrnak, hogy lehetőséget biztosított az Élettani Intézetben a szakmai céljaim eléréséhez. Köszönetet szeretnék mondani Dr. Jenei Attilának a PhD éveim alatt nyújtott támogatásáért. Hálámat szeretném kifejezni Rajnavölgyi Éva professzor asszonynak, aki lehetővé tette számomra a tudományos életem elindítását az Immunológiai Intézetben.

Hálás vagyok kolléganőmnek, Dr. Varga Aliznak, hogy megtanította nekem a molekuláris biológiai módszerek alapjait, és kiváló munkájával hozzájárult a kísérletek sikerességéhez. Barátságával mindig kellemes munkahelyi légkört biztosított számomra.

Szeretném hálámat kifejezni az Élettani Intézet és az Immunológiai Intézet valamennyi munkatársának, akik önzetlen segítségükkel és támogatásukkal segítették munkámat.

Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok a családomnak, különösen édesanyámnak a szeretetért és hogy mindig mellettem volt, meghallgatott és bátorított a nehéz időkben is. Továbbá hálás vagyok a barátaimnak a türelmükért és támogatásukért.