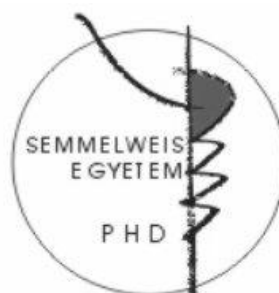


A T-limfociták aktivációjának és egyes mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata

Doktori tézisek

Molnár-Érsek Barbara

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Nagy György PhD, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Vásárhelyi Barna DSc, egyetemi tanár

Dr. Kovács László PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Oláh Imre DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Prohászka Zoltán DSc, egyetemi tanár

Dr. Bajtai Zsuzsa PhD, egyetemi docens

Budapest
2012

Bevezetés

Az immunrendszer fiziológias működését az immunsejtek jelátviteli utakon keresztül szabályozott külső szignálokra adott válasza, és e folyamatok összehangolt együttműködése biztosítja. Ha az immunrendszer összetett hálózatának valamely eleme vagy ezek egy csoportja működésbeli eltéréshez vezető változást szenved el, az kóros folyamatok kialakulását eredményezheti, ami végső soron betegségek kialakulásában manifesztálódhat. Az immunrendszer betegségei között megkülönböztethetünk alul-, illetve túlműködéssel járó kórképeket. Alulműködéssel járnak a veleszületett és szerzett immunhiányos állapotok, míg az immunrendszer egyes funkcióinak fokozott működésével jellemezhető többek között számos gyulladással járó autoimmun betegség, illetve az asztma. Az autoimmun betegségek kialakulásában összetett mechanizmusok játszanak szerepet, amelyekben nem tehető egymagában felelőssé egy adott sejttípus vagy folyamat sem, és mind genetikai, mind környezeti faktorok alapvető szerepet játszanak kialakulásukban. Mégis, a betegséghez vezető folyamatokban kiemelhetőek bizonyos kulcsszerepet betöltő jelátviteli útvonalak, amelyek jellemzőek a kóros válaszokra és kialakítják a betegség karakterét.

A gyulladással járó autoimmun betegségek egyik jó példája a rheumatoid arthritis (RA). A rheumatoid arthritis a kisízületek gyulladásával járó autoimmun betegség. Kialakulásában szerepet játszanak a HLA-allélek DRB1*04 csoportjába tartozó haplotípusok, továbbá a PTPN22 hajlamosító allélvariánsok jelenléte, illetve környezeti eredetű kockázati tényezők is ismertek, mint amilyen a dohányzás. Patomechanizmusában kulcsszerepet tölt be a megváltozott citokin környezet és az immunsejtek kóros működése.

A tumor nekrozis faktor α (TNF α , továbbiakban TNF) egy rendkívül sokoldalú proinflammatorikus citokin, amely helyi és szisztémás hatásokkal egyaránt rendelkezik és a szervezetszintű gyulladással járó reakció kulcsszereplőjeként működik. Szolubilis ligandként számos sejttípusban kifejeződő receptoraihoz (TNFR1, TNFR2) kötődve fejt ki hatását, de membránhoz kötött formája is befolyásolja a sejtfunkciókat. Az RA-ban megfigyelhető gyulladás kialakulásának egyik kulcseleme a TNF emelkedett jelenléte, - amelyet mind RA-s betegek szérumában, mind a szinoviális folyadékából származó mintákban megfigyeltek-, valamint a T-sejtek megnövekedett TNFR expressziója. A TNF felszabadulása további gyulladással járó citokinek felszabadulását segíti elő, mint az IL-6, IL-1 és GM-CSF, aminek következtében krónikus gyulladás alakul ki a szinoviumban. A TNF elsődleges szerepét a betegség kialakulásában jól tükrözi, hogy napjainkban öt kereskedelmi forgalomban kapható TNF gátló készítmény létezik, amelyek az egyik leghatékonyabb terápiás lehetőséget jelentik RA-ban.

Munkánk során néhány az immunrendszer sejtjeinek szabályozásában alapvető szerepet játszó jelátviteli folyamatot vizsgáltunk.

A CD3 ζ -lánc három aktivációs tirozin motívumával (ITAM) az egyik legfontosabb jelátvivő lánc a T-limfocita aktiváció során. A T-sejt receptor (TCR) antigénnel történő keresztkötése indukálja az p56^{Lck} protein tirozin kináz foszforilációját, ami a ζ -láncok foszforilációjához vezet, lehetővé téve további molekulák kapcsolódását. A jelátvitel egyik fontos mozzanata az intracelluláris Ca²⁺ szint emelkedése és a megváltozott génexpressziós mintázat. A célgének bekapcsolódása következtében többek között a citokin termelés megindulása figyelhető meg, amelyben az IL-2 központi szerepet játszik. Az aktiváció mértékének szabályozása, illetve a T-sejtek antigén felismerő képessége a sejtfelszínen lévő ζ -lánc mennyiségétől és foszforiláltsági állapotától függ. A ζ -lánc a többi TCR-lánctól függetlenül is internalizálódhat, és mivel a többi lánchoz viszonyítva hosszú féléletidővel rendelkezik, az internalizációt követően akár újra a sejtfelszínre kerülhet. A folyamatos internalizáció, továbbá az aktiváció által indukált ζ -lánc csökkenés fontos szabályozója az src-like adaptor fehérje (SLAP). A SLAP SH2 doménon keresztül kapcsolódik a konstitutívan foszforilált, illetve az aktiváció során foszforilálódó ζ -láncokhoz. A láncok sorsa kétfelé ágazhat: lebontásra kerülhetnek, vagy újra kijuthatnak a sejtfelszínre. A CD3 ζ -lánc lizoszómális vagy egyelőre nem teljesen tisztázott mechanizmus keretében proteaszómális úton is degradálódhat.

Az RA-ban megfigyelhető kóros T-limfocita működés jellemzője a csökkent CD3 ζ -lánc expresszió és a sejtek alacsony aktiválhatósága.

A hízósejtek mind a természetes, mind az adaptív immunválaszban fontos szerepet töltenek be. Éretlen formában kerülnek ki a csontvelőből a perifériára, és differenciációjuk csak a szövetekbe történő bevándorlást követően fejeződik be. Legjobban ismert funkciójuk az allergiás reakciók kialakítása, az IgE-t nagy affinitással kötő Fc-receptorukon keresztül kiváltott degranuláció folytán. Ugyanakkor hozzájárulnak az RA patomechanizmusához is, amelyet szinoviális megjelenésük és Fc-receptor indukálta aktivációjuk igazol.

A jelátviteli molekulák sejtből fellelhető aktuális mennyisége transzkripcionális és poszt-transzkripcionális szabályozás alatt áll. Utóbbi, az egyre nagyobb hangsúlyt kapott mikroRNS-ek közvetítésével történhet. Az érett mikroRNS-ek (miRNS) ~20-26 nukleotid hosszúságú szekvenciák, amelyek speciális fehérje komplexekkel asszociáltan komplementer kettős szálakat képeznek az mRNS-ekkel, így gátolják a translációt vagy elősegítik a cél mRNS lebomlását. Egy-egy mikroRNS által közvetített hatás feltérképezésében nagy jelentőséget kapnak az ún. target predikciós eljárások, amelyek lényege, hogy a szekvencia komplementaritás, konzerváltság és egyéb tényezők alapján megjósolják egy-egy miRNS lehetséges célpontjait. Számos miRNS-ről leírták, hogy variánsaik és megváltozott expressziójuk asszociált bizonyos betegségekkel.

A T-sejt aktiváció szabályozásában a közelmúltban írták le a mir-155 mikroRNS szerepét. Megváltozott expressziója összefüggésbe hozható számos betegséggel, köztük RA-val és atópiás

dermatitisszel. Mir-155 knock-out állatokban sérül az immunológiai memória és a regulatórikus T-sejt funkció is, valamint hiányában nem alakul ki kollagén-indukált experimentális arthritis. A mir-181a elsősorban T-sejtek szelekciójában és aktivációjában tölt be fontos szerepet. Hiányában növekszik az autoreaktív sejtek aránya. A T-limfocita aktiváció befejeződésében kulcsfontosságú molekulákat, mint például a PTPN22-öt vagy a DUSP6-ot csendesíti. A mir-146a megváltozott expressziója szintén jellemző RA-ban szenvedő betegek szinoviális sejtjeiben. Legjobban tanulmányozott célpontjai a TNF jelátvitel elemei (TRAF6, IRAK1), de ettől független, a T-limfocita aktivációban részt vevő fehérjék is szerepelnek célpontjainak listáján. A mir-132 legújabb eredmények szerint biomarkerként is használható lehet RA diagnosztikájában, mivel a plazmában egészségesekéhez viszonyítva szignifikánsabban alacsonyabb szintje mérhető, ugyanakkor szinoviális mintákban emelkedett mennyiségben van jelen.

Célkitűzések

A CD3ζ-lánc szabályozásának vizsgálata humán T-limfocitákban

1. A TNF hatásának vizsgálata a CD3ζ-lánc kifejeződésére:

- a. A ζ-lánc expresszió mérése különböző koncentrációjú és időtartamú TNF kezelés mellett.
- b. A ζ-lánc internalizáció vizsgálata.
- c. A CD3 komplex egyéb láncainak vizsgálata TNF hatására.
- d. A ζ-lánc mRNS expressziójának mérése.
- e. A ζ-lánc foszforiláció vizsgálata.

2. A T-limfocita aktiváció vizsgálata TNF jelenlétében:

- a. A Ca²⁺-válasz mérése.
- b. Az IL-2 termelés meghatározása.
- c. A proliferáció meghatározása.

3. A CD3ζ lebomlásának vizsgálata:

- a. A bomlás helyszínének meghatározása.
- b. A SLAP adaptor fehérje expressziójának vizsgálata TNF hatására.
- c. A SLAP-CD3ζ kolokalizációjának vizsgálata.
- d. A SLAP szerepének vizsgálata a CD3 ζ-lánc bomlásában.

4. A SLAP vizsgálata RA-s betegekben:

- a. A SLAP expresszió mérése T-limfocita sejtvonalon és egészséges kontrollok T-limfocitáiban.
- b. A SLAP expresszió mérése RA-ban szenvedő betegek T-limfocitáiban.

5. A SLAP szabályozásának vizsgálata.

MikroRNS-ek vizsgálata humán T-sejtekben és hízósejtekben

1. A mir-155, mir-181a és mir-146a vizsgálata TNF hatására T-limfocitákban.

2. A mir-132 vizsgálata hízósejtekben.

Módszerek

Sejtek, sejtvonalak

Sejtvonalon végzett kísérleteinkhez Jurkat (ATCC, E6.1) humán T limfóma sejteket használtunk. A primer sejtekkel történő kísérletezéshez teljes vérből izoláltunk mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich) grádiens centrifugálással.

CD4+ T-sejteket mágneses elven történő negatív szelekcióval (Miltenyi Biotec) szeparáltunk. A T-limfocitákat RPMI-1640 10% FBS, 2mM glutamin (PAA) jelenlétében tenyésztettük.

Humán hízósejt differenciáltatáshoz teljes köldökzsínór vérből származó PBMC sejtek CD34+ frakcióját szintén mágneses elven szeparáltuk, majd 8 hétig tenyésztettük 1×10^6 koncentrációban RPMI-1640 10% FBS, 2mM glutamin, 0,1% nem esszenciális aminosav oldatban (PAA), 100 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-6 (ImmunoTools) és $3 \mu\text{M}$ lizofoszfátidsav (Sigma-Aldrich) jelenlétében.

Betegek, donorok

Az RA-s vérmintákat a Budai Irgalmasrendi Kórház biztosította. A diagnózis felállítása minden esetben az American College of Rheumatology kritériumai szerint történt. A vizsgált betegek biológiai terápiában (TNF-blokkoló) vagy DMARD (Disease-modifying antirheumatic drug) terápiában részesülő csoportokra oszthatóak. Kontrollként minden esetben önkéntes véradóktól származó mintákat használtunk.

A köldökzsínór véreket a Semmelweis Egyetem I. Számú Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikája biztosította.

Sejt aktiváció, kezelés

T-limfocita aktiváláshoz $1 \mu\text{g/ml}$ PHA-t (Sigma-Aldrich) vagy anti-CD3/CD28-al konjugált gyöngyöket (Invitrogen) használtunk 4-24 órán át. A megfelelő csoportokban 2 órás TNF (40 ng/ml, BD Biosciences) előkezelést alkalmaztunk az aktiváció előtt, PBMC sejtek esetében pedig 2 óra előzetes aktiváció volt szükséges a TNF hozzáadása előtt. A sejteket általában 40 ng/ml TNF-fel 4-24 órán át kezeltük. A lizoszómális degradációt ammónium-kloriddal (10 mM, Sigma-Aldrich), a proteaszómális lebontást pedig MG-132-vel (100 nM, Calbiochem) gátoltuk, amit a 24 órás TNF kezelés követett.

Hízósejt aktivációhoz a sejteket egy éjszakán át mielóma eredetű IgE-vel (Serotec) szenzitizáltuk, majd mosás után anti-humán IgE-vel (Dako) keresztkötöttük 2 órán keresztül.

Western blot

A Western blotra felhasznált mintákat 1% NP-40-nel, proteáz- és foszfatázgátlókkal (Sigma-Aldrich) kiegészített gyári oldatban (Fermentas) lizáltuk jégen, majd centrifugálást ($14000 \times g$, 4°C) követően a felülúszókkal dolgoztunk. Az összfehérje mennyiséget Lowry micro módszerrel (Sigma-Aldrich) határoztuk meg. A mintákat 12% gélen választottuk szét, majd PVDF membránra

(BioRad) vittük át. A megfelelő antitestekkel történő inkubáció után, a vizualizációt ECL oldat (Amersham) használatát követően standard röntgen-filmen végeztük.

A denzitometriát ImageJ programmal (National Institutes of Health) végeztük, majd a bemérési kontrollra (β -aktin, γ -tubulin vagy Ponceau festés), illetve a kezeletlen kontrollra normalizáltunk.

Áramlási citometria

A sejteket 4°C-on jelöltük a megfelelő antitestekkel 0,5% BSA/PBS oldatban. A méréseket BD FACS Calibur berendezésen végeztük, és az eredményeket FlowJo (Tree Star) program segítségével értékeltük ki. A Ca^{2+} válasz méréshez Fluo-4 AM-mel, a proliferáció méréséhez CFSE festékkel (mindkettő Invitrogen) töltöttük fel a sejteket.

Transzfekció

Egyes kísérletekben a SLAP csendesítésére specifikus siRNS-eket (Life Technology) és kontroll siRNS-eket; a konfokális mikroszkópiához pedig GFP-vel ellátott teljes SLAP cDNS vektort vittünk a sejtekbe Amaxa nukleofektor (Lonza) berendezés segítségével.

Konfokális mikroszkópia

A letapasztás után a sejteket permeabilizáltuk, és a megfelelő antitestekkel (CD3 ζ , LAMP1, Golgi 58K) vagy festékekkel (Lysotracker, Draq5, kolera toxin) jelöltük. Négy optikai csatornával felszerelt FluoView 500 konfokális lézerpasztázó mikroszkópot használtunk (NA:1.45) 60x immerziós objektívvel (Olympus). A kolokalizáció mértékét ImageJ szoftver GSCD plugin csomagja segítségével, mintánként ~100 sejtet egységként (ROI) definiálva határoztuk meg, a Pearson-féle korrelációs koefficienseket megadva. Az integrált intenzitás értékeket Fluoview 5.0 szoftver (Olympus) segítségével adtuk meg, szintén sejtenként átlagolva.

Valós idejű RT PCR

Az mRNS-t RNeasy kit (Qiagen), míg a mikroRNS-t miRNeasy kit (Qiagen) segítségével vontuk ki. MikroRNS esetében a reverz transzkripcióhoz specifikus primereket (Life Technologies), míg mRNS esetében random primereket (Promega) használtunk. A valós idejű PCR-t specifikus primerek jelenlétében ABI 9700 (Life Technologies) berendezésen mértük, és a HGPRT-hez vagy RNU6B-hez viszonyított relatív expressziókat vettük figyelembe.

ELISA

Méréseink során a felülúszókból szendvics ELISA technikával (BD Biosciences) történt a citokinek meghatározása.

MikroRNS target predikció

Az online elérhető target predikció pontosságának növelése céljából, a különböző algoritmusokat használó programokkal (PicTar, MiRBase, TargetScan) azonosított targetekből összesített listát állítottunk fel. A különböző kapcsolódási valószínűséget meghatározó pontokból rangsort állítottunk fel.

Statisztika

A következő módszereket használtuk: Student-féle t-teszt, Mann–Whitney U rank-sum teszt, Wilcoxon matched pairs teszt és ANOVA.

Eredmények

Munkánk kezdetén arra a kérdésre kerestük a választ, hogy összefüggésbe hozható-e egymással az autoimmun betegségekben megfigyelhető alacsony T-limfocita válaszkészség, illetve a sejtek környezetében nagy koncentrációban jelen lévő TNF.

Elsőként megvizsgáltuk, hogy a TNF direkt módon befolyásolja-e a CD3 jelátvivő láncainak mennyiségét. Western blottal végzett méréseinkből kiderül, hogy a TNF dóziszfüggő (5-80 ng/ml) módon csökkenti a CD3 ζ jelátvivő láncának mennyiségét mind Jurkat ($p < 0,05$), mind primer sejteken ($p < 0,05$) vizsgálva. Ezen megfigyelésünket konfokális mikroszkópiával is alátámasztottuk, ahol a TNF-fel (40 ng/ml, 24 óra) kezelt sejtekben található ζ -lánc integrált pixel intenzitását hasonlítottuk össze a kezeletlen sejtekével ($p < 0,00002$). Kimutattuk továbbá, hogy mindaddig, amíg a TNF jelen van a rendszerben (24-72 óra) a ζ -lánc csökkenés megfigyelhető; valamint azt is, hogy a TNF eltávolításával az expresszió szintje helyreáll. Képkötő eljárással kimutattuk, hogy a TNF elsősorban a sejt felszíni láncok csökkenését segíti elő.

Mivel a CD3 ζ szoros asszociációban áll a többi TCR láncsal, kíváncsiak voltunk arra, hogy tapasztalható-e a csökkenés más láncok esetében is. Western blottal vizsgáltuk a CD3 ϵ és γ -lánc összfehérje szintjét, valamint megvizsgáltuk az ϵ -lánc sejt felszíni érintettségét is áramlási citometriával. Eredményeink szerint esetükben nem történik változás az expresszióban TNF hatására. További vizsgálatainkban a mechanizmus feltárására törekedtünk, amelynek során megvizsgáltuk, hogy a TNF mRNS szinten szabályozza-e a CD3 ζ mennyiségét, az átíródás csökkentésével. Valós idejű RT PCR-rel (4 óra-15 nap, 2,5-80 ng/ml TNF) mértük az mRNS expressziót és azt tapasztaltuk, hogy sem az idő, sem a koncentráció nem befolyásolja az mRNS mennyiségét, tehát a szabályozás poszttranszkripcionális szinten érvényesül.

Ebből kiindulva feltételeztük, hogy a TNF a ζ -láncok internalizációját és lebomlását segíti elő. Ennek igazolására, a TNF kezelés előtt gátoltuk a lizoszómális, illetve a proteaszómális lebontást, majd a mintákat Western blottal elemeztük. A lizoszóma szelektív gátlása nem akadályozta meg a ζ -lánc csökkenést, azonban a proteaszóma gátlása kivédte a TNF által indukált CD3 ζ csökkenést ($p < 0,05$). Eredményünket konfokális mikroszkópiával erősítettük meg, ahol a CD3 ζ és a LAMP-1 lizoszóma asszociált fehérje kolokalizációját vizsgáltuk. Egyértelműen látható, hogy szemben a pozitív kontrollként használt anti-CD3 kezeléssel kiváltott aktivációval, a TNF kezelt csoportban nem mutatható ki kolokalizáció a két molekula között. Kísérleteink következő szakaszában azokra a molekulákra koncentráltuk, amelyek részt vesznek a CD3 ζ szabályozásában. A SLAP irodalmi adatok szerint kapcsolódik a CD3 ζ -láncához és részt vesz annak ciklizációjában. Western blot rendszerben kimutattuk, hogy a SLAP fehérje mennyisége növelhető TNF hozzáadásával ($p < 0,05$), így lehetséges, hogy részt vesz a ζ -lánc TNF által elősegített szabályozásában. Ennek igazolására konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk, hogy létrejön-e asszociáció a két molekula között a TNF

hatására. A sejteket SLAP-GFP fúziós cDNS vektorral transzfektáltuk, majd TNF-fel kezeltük és a CD3 ζ -láncot antitestekkel jelöltük. A kezeletlen sejtekhez viszonyítva, ahol a két molekula a sejt eltérő régióiban helyezkedik el, a TNF kezelés hatására kolokalizáció jön létre közöttük ($p < 0,01$). A következő lépésben Jurkat sejteket transzfektáltunk a SLAP-ot specifikusan csendesítő siRNS-ekkel illetve kontroll siRNS-ekkel, majd TNF-fel kezeltük őket és Western blot rendszerben vizsgáltuk a ζ -lánc expresszióját. A kontroll siRNS-sel transzfektált mintákban a vártnak megfelelően látható volt a TNF ζ -láncot csökkentő hatása, azonban a SLAP-ot nem expresszáló sejtekben ez a hatás elmaradt.

A SLAP a foszforilált ζ -láncokhoz kötődik, amelyek arányában eredményeink szerint növekedés következik be TNF jelenlétében ($p < 0,05$).

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a tapasztalt ζ -lánc csökkenéssel összefüggésben megfigyelhető-e változás a sejtek válaszkészségében. TNF kezeléssel csökkentettük a CD3 ζ expresszióját, majd anti-CD3 aktiváltuk őket (6, 24, 72 óráig) és a felülúszóból IL-2-t mértünk ELISA rendszerben. Megfigyelésünk szerint a TNF-fel előkezelt csoportban minden időpontban szignifikánsan alacsonyabb ($24\text{ó } p < 0,01$) IL-2 termelés figyelhető meg, mint a TNF-fel nem kezelt csoportokban. A Ca^{2+} válaszban szintén tapasztaltunk eltéréseket: mind a válasz amplitúdóját, mind lefutásának idejét csökkent mértékűnek találtuk a TNF hatására. A sejtek *in vitro* proliferációs kapacitását ugyanakkor nem befolyásolja a TNF.

Zymosan-indukált experimentális arthritisre fogékony állatban, SLAP kiütése jelentősen csökkenti mind a betegség kialakulásának gyakoriságát, mind lefolyásának súlyosságát, ezért megvizsgáltuk, hogy van-e eltérés a SLAP expresszióban RA-s betegek T-limfocitáiban. Ehhez RA-s ($n=10$), illetve kor és nem asszociált egészséges kontrollok ($n=6$) perifériás CD4 $^+$ T sejteit izoláltuk, és Western blot rendszerben vizsgáltuk SLAP expresszióját. A betegekben $\sim 4\text{x}$ magasabb SLAP expressziót találtunk ($p < 0,05$), mint az egészségesekben, aminek jelentősége lehet a betegség patomechanizmusa szempontjából.

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy van-e különbség az RA-s és egészséges T-sejtek TNF-re adott válaszában tekintetében SLAP expresszió szempontjából. A betegcsoportokból, illetve az egészségesekből származó CD4 $^+$ T limfocitákat TNF jelenlétében aktiváltuk és Western blottal határoztuk meg SLAP expresszióját. Az egészségesekből és a DMARD-dal kezelt betegből ($n=5$) származó mintákban SLAP expresszió az idáig megfigyeltekkel megegyezően megnövekedett TNF hatására ($p < 0,05$), azonban ez a válasz érdekes módon elmaradt a TNF-blokkolóban részesülő betegek ($n=5$) mintáiban.

A SLAP TNF kezelésre bekövetkező emelkedésének magyarázatára valós idejű RT PCR-rel vizsgáltuk expresszióját TNF jelenlétében, amiben meglepő módon nem találtunk változást. Így feltehetően a SLAP degradációja lehet érintett a folyamat során. Ebben a poszttranszkripcionális

szabályozásban a miRNS-ek által közvetített hatást valószínűsítjük. A target predikciós adatok alapján, amelyben 12 algoritmust vettünk figyelembe, első helyen szerepel a mir-155 és megtalálható a mir-181a is.

Kísérleteink következő szakaszában annak felderítése volt a cél, hogy bizonyos miRNS-ek hogyan befolyásolják a sejtek aktivációját, illetve az RA-ban releváns miRNS-ek expressziója hogyan változik.

A mir-155, mint a SLAP-ot legvalószínűbben csendesítő és az RA-ban is releváns szerepet betöltő miRNS expresszióját TNF jelenlétében, anti-CD3/CD28-al aktivált humán CD4+ T-limfocitákban RT-PCR-rel vizsgáltuk. Eredményeink szerint, az aktiváció során jelentős emelkedést mutató mir-155 expresszió TNF jelenlétében kevésbé nyilvánul meg ($p < 0,05$). A mir-155-re elvégzett target predikciós eljárás segítségével meghatároztuk valószínű célpontjait, amelyek között megjelenik SLAP is, a jelátvitelben fontos molekulák mellett. A mir-181a vizsgálata során az irodalmi adatoknak megfelelően, expresszió csökkenést tapasztaltunk az anti-CD3/CD28 által kiváltott aktiváció hatására RT PCR-rel vizsgálva. Abban az esetben azonban ha TNF-et is adtunk a rendszerhez, nem következik be ez a csökkenés. Változást figyeltünk meg a mir-146a expressziójában is TNF jelenlétében. Az anti-CD3/CD28 hatására létrejövő expressziós maximuma 2 órás aktiváció után figyelhető meg, míg ugyanez TNF jelenlétében csak 6 óránál következik be. Emellett, tendenciózusan magasabb mir-146a expresszió detektálható ugyanezen feltételek mellett, a legtöbb vizsgált időpontban (1, 2, 6, 10, 24, 72 óra). Humán köldökzsinórvérből differenciáltatott hízósejtekben vizsgáltuk az RA-s szinoviális folyadékban, nagy mennyiségben jelen lévő mir-132 expresszióját. Az aktiváció modellezésére IgE-vel történő szenzitizáció után a kötődött IgE molekulákat anti-IgE-vel keresztkötöttük, majd valós idejű RT-PCR-rel vizsgáltuk a mir-132 szintjét. Szignifikáns növekedés tapasztalható ($p < 0,05$) a specifikus aktiváció hatására.

Következtetések

- 1.** A TNF szelektíven és reverzibilisen csökkenti a T-sejtben található CD3 ζ -láncok mennyiségét, amely közvetlenül hozzájárul a sejtek alacsonyabb aktiválhatósági állapotához.
- 2.** Megfigyeléseink szerint a TNF megnöveli a ζ -lánc szabályozásában kulcsszerepet játszó SLAP fehérje mennyiségét, és elősegíti a SLAP és a CD3 ζ közötti kolokalizációt. A TNF által indukált ζ -lánc csökkenés kivédhető a SLAP csendesítésével.
- 3.** A CD3 ζ -lánc lebomlási folyamatainak vizsgálatai rámutatnak, hogy míg a TCR közvetítésével érkező jelek hatására a lizoszómális degradáció túlsúlyos jellemző, addig TNF jelenlétében a lebontásban a proteaszómák szerepe hangsúlyos. Mindezt elősegítheti a SLAP-asszociált ubiquitin szignált generáló fehérjék ζ -láncához történő asszociációja.
- 4.** További eredményeink szerint RA-ban szenvedő betegek T-limfocitáiban emelkedett a SLAP expressziója. Mindez arra enged következtetni, hogy a SLAP-nak szerepe lehet a betegség patomechanizmusában.
- 5.** A target predikciós eljárások eredménye alapján valószínűnek látszik, hogy a SLAP aktuális mennyiségének szabályozásában a miRNS-ek által közvetített gátlás is szerepet játszhat.
- 6.** Az RA-val összefüggésben leírt, megváltozott expressziót mutató miRNS-ek rendre eltérő kifejeződést mutatnak TNF jelenlétében. Egyik képviselőjük, a mir-132 kifejeződése fokozódik a hízósejtek aktivációja során. A mir-155 és a mir-181a TNF jelenlétében bekövetkező eltérő regulációja a TNF T-limfocita aktivációt szabályozó szerepük mellett szól.

Összességében eredményeink szerint a TNF emelkedett szintje a T-limfociták környezetében megváltoztatja azok működését, és így befolyásolhatja az immunválasz kimenetelét.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Ersek B**, Molnar V, Balogh A, Matko J, Cope AP, Buzas EI, Falus A, and Nagy G. (2012) CD3zeta-chain expression of human T lymphocytes is regulated by TNF via Src-like adaptor protein-dependent proteasomal degradation. J Immunol, 189:1602-1610.

IF: 5,788

2. Molnar V, **Ersek B**, Wiener Z, Tombol Z, Szabo PM, Igaz P, and Falus A. (2012) MicroRNA-132 targets HB-EGF upon IgE-mediated activation in murine and human mast cells. Cell Mol Life Sci, 69:793-808.

IF: 6,570

Az értekezésben felhasznált közlemények kumulatív impakt faktora: 12,385

Az értekezésben fel nem használt közlemények:

3. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, **Ersek B**, Buzas E, and Perl A. (2010) Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther, 12:210.

IF: 4,689

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: 17,047

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Falus András Professzor Úrnak, hogy TDK-, majd PhD hallgatóként lehetőséget adott, hogy az Intézetben dolgozhassak, és olyan légkört teremtett, amelyre mindig szeretettel gondolhatok.

Szeretném megköszönni Buzás Edit Professzor Asszonynak, hogy már első találkozásunk alkalmával bizalmat adott nekem és befogadott a munkacsoportjába. Megmutatta számomra, hogy a munkában a kiváló szakmai tanácsok mellett, milyen fontos szerepe van az emberi kapcsolatoknak is.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Dr. Nagy Györgynek, hogy TDK- és PhD hallgató éveim alatt mindig számíthattam rá mind emberileg, mind kutatóként. A kutatás feltételeinek megteremtésén túl, nyitottsága, és a saját ötleteim megvalósításának támogatásában mutatott hozzáállása, példaértékű számomra. Nagyon szerencsésnek érzem magam, hogy irányítása alatt végezhettem a munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Szente-Pásztói Máriának, amiért a kezdetektől fogva számíthattam a segítségére. Számos fontos módszer mellett, megtanította nekem azt a precizitást, amely minden kutatómunka alapját képezi.

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Matkó Jánosnak és Dr. Balogh Andreának, az ELTE Immunológiai Tanszékéről, hogy tudásukkal, ötleteikkel segítették a munkámat.

Köszönöm Dr. L. Éder Katalinnak, hogy kiváló ötleteivel és tanácsaival nagyon sokat tett hozzá ahhoz, hogy a munkám kerek egészzé váljon.

Férjem, Dr. Molnár Viktor, amellet, hogy mindvégig mellettem állt, rengeteg módszer elsajátításában segített, és tanácsaival, nagyszerű meglátásaival, valamint a felém tanúsított türelmével nagyban hozzájárult ahhoz, hogy azzá váljak, aki most vagyok.

Szüleim és családom támogatása nélkül sosem sikerült volna idáig eljutnom. Szeretettel és lelkesedéssel ösztönöztek, hogy megvalósíthassam az elképzeléseimet.

Végül, de nem utolsó sorban köszönök minden segítséget a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet összes munkatársának, és azt is, hogy befogadtak maguk közé.