

A GM-CSF receptor β internalizációjának és az autofágiának a szerepe az EMT és a MET szabályozásában

Doktori tézisek

Zsiros Viktória

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. L. Kiss Anna, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Löw Péter, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Mandl József, D.Sc., professor emeritus

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Lotz Gábor, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Homolya László, D.Sc., tudományos tanácsadó

Budapest
2019

1. Bevezetés

Az epitheliális-mesenchymális átalakulás (EMT) egy olyan biológiai folyamat, amely során a polarizált hámsejtek morfológiai és molekuláris változások révén mesenchymális fenotípussal rendelkező sejtekké differenciálódnak: elveszítik polaritásukat, a szomszédos sejtekkel és a bazális membránnal való kapcsolataikat; átszerveződik a sejtváz szerkezetük; megváltozik a génexpressziós mintázatuk és képesek lesznek a migrációra. A mesenchymális-epitheliális átalakulás (MET) az EMT fordítottja, eredményeként a mesenchymális jellegű sejtek visszanyerik hám tulajdonságaikat.

Korábbi munkáinkban igazoltuk, hogy a Freund adjuváns indukálta gyulladás során a patkányok hashártyájának mesothel sejtei elveszítve hám tulajdonságaikat mesenchymális, makrofág-szerű sejtekké differenciálódnak (EMT II.), majd a gyulladás csúcspontja után beindul a regeneráció (MET), amelynek eredményeként a sejtek az injektálást követő 11. npra visszanyerik eredeti laphám fenotípusukat.

Számos faktor képes EMT-t és MET-et indukálni. Egyik ilyen faktor a vérképzésben is fontos szerepet játszó immunmodulátor, a granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF). A GM-CSF döntő szerepet játszik a dendritikus sejtek érésében; a granulociták és makrofágok differenciálódásában, túlélésében és aktiválásában; mindemellett számos nem hematopoetikus funkciója is van, amellyel hozzájárul a gyulladásos válaszok kialakításához.

GM-CSF-et számos sejtfeleség képes termelni. Korábbi vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a Freund adjuváns indukálta

gyulladás során a mesothel sejtek is termelnek GM-CSF-et. A GM-CSF heteromer receptorához kötve képes hatását kifejteni. A receptor komplex egy ligand-specifikus, ligandot kötő α alegységből (GM-CSFR α), valamint a jelátvitel beindításáért felelős β alegységből (GM-CSFR β) áll. A receptor mindkét alegységét számos sejt - a mesothel sejtek is - képes expresszálni.

A GM-CSF által indukált jelátviteli útvonalak jól ismertek, arra vonatkozóan azonban kevés adat áll rendelkezésünkre, hogy ezen jelátviteli folyamatok beindulásához szükséges-e a receptor internalizációja. Bár vannak irodalmi adatok, amelyek a GM-CSF receptor internalizációját leírják, ezek azt sugallják, a jelátvitel kezdeti aktivációs eseményei a receptor internalizációja nélkül is végbemennek. Ezzel szemben korábbi eredményeink egyértelműen azt mutatták, hogy ha a receptor dinamin-függő internalizációját dynasore kezeléssel gátoljuk, a GM-CSF kezelés hatására sem megy végbe az EMT. PhD munkám során ezért a GM-CSF jelátvitel beindításáért felelős GM-CSFR β internalizációját, és a receptor internalizációt követő citoplazmatikus útvonalát vizsgáltam.

Munkám másik nagy témája a mesothel sejtek regenerációjában szerepet játszó molekuláris folyamatok vizsgálata volt. Előzetes morfológiai és morfometriai eredményeink ugyanis azt mutatták, hogy a mesothel sejtek gyulladást követő regenerációja, az eredeti laphám fenotípus visszaállítása (MET) során, a szükségtelen sejtalkotók és citoplazmatikus komponensek, fehérjék eltávolítása progresszív autofágia révén megy végbe. Az autofágia egy olyan sejtleletani folyamat, amely során a sejt saját fehérjéit, anyagait,

sejtorganellumait lizoszómális degradáció révén lebontja. Kitüntetett szerepet játszik a sejtek túlélésében, a szöveti regenerációban, a celluláris homeosztázis fenntartásában, a gyulladásos folyamatokban, az immunitásban és a sejtes stresszválasz kialakításában is. Az autofágia különböző lépéseiben (iniciációtól a degradációig) összeszerelődő bonyolult molekuláris gépezet - az Atg fehérjék közreműködésével - azt sugallja, hogy a folyamat szabályozása rendkívül összetett, és több ponton is történhet. Az egyik legfontosabb, autofágiát szabályozó jelátviteli folyamat a PI3K-Akt-mTOR útvonal, amelyben a kulcs szerepet játszó mTOR komplex aktiválódása gátolja az autofágiát. Munkám ezen, második részében tehát vizsgáltam, hogy az autofágia szabályozásában szerepet játszó faktorok (Akt/p-Akt, mTOR/p-mTOR, EEA1, Rab7, Beclin-1 (Atg6) és LC3B (Atg8)) expressziója hogyan változik a gyulladás és a gyógyulás ideje alatt; és megtörténik-e a mesothel sejtek regenerációja, ha gátoljuk az autofágiát. Továbbá az irodalomból ismert, hogy a BMP fehérjék MET-et indukáló, EMT-t ellensúlyozó faktorok. Vizsgáltam tehát, hogy a mi rendszerünkben a BMP fehérjék elősegítik-e a regeneráció folyamatát.

2. Célkitűzés

1.) A gyulladás során a mesothel sejtek termelik a GM-CSF citokint és expresszálják receptorát. *In vitro* kísérleteink alátámasztották, hogy a GM-CSF és/vagy TGF- β kezelés hasonló fenotípusos átalakulást indukál, mint a Freund adjuváns. Előzetes kísérleteink arra utaltak, hogy a GM-CSF jelátviteli folyamatához a receptor-ligand internalizációja elengedhetetlen. Munkám során elsőként tehát a következő kérdések megválaszolására törekedtem:

- ❖ A mesothel sejtek expresszálják-e a jelátviteli utak beindításáért felelős GM-CSF receptor β -t?
- ❖ A GM-CSFR β milyen útvonalon internalizálódik, és milyen endocitotikus vezikulákban (korai, késői és reciklizáló endoszóma) mutatható ki a jelátviteli folyamat során?
- ❖ A különböző kezelések hatására hogyan változik a GM-CSF jelátvitelében fontos szerepet játszó STAT5 transzkripciós faktor foszforilált, aktív formájának expressziója és lokalizációja a mesothel sejtekben?
- ❖ A mesothel sejtekben expresszálódik-e olyan negatív regulátor, amely a GM-CSF jelátviteli útvonalainak gátlásával leállítja az EMT folyamatát?

2.) Munkám második részében vizsgáltam, hogy az autofágia milyen szerepet játszik a mesothel sejtek regenerációjában. Az alábbi kérdésekre kerestem a választ:

- ❖ Az autofágiában közvetett (Akt/p-Akt, mTOR/p-mTOR, EEA1, Rab7) és közvetlen (Beclin-1, LC3B) módon szerepet

játszó markerek hogyan expresszálnának a gyulladás és a gyógyulás különböző időpontjaiban?

- ❖ A MET-et indukáló BMP fehérjék elősegítik-e a mesothel sejtek gyógyulását, és visszafordítják-e az EMT folyamatát?
- ❖ Végbemegy-e a mesothel sejtek regenerációja, ha az autofágiát bafilomycin A1 kezeléssel gátoljuk?

3. Módszerek

3.1. Állat modell

In vivo kísérleteinkhez 60-70 napos (200-300 g) hím Sprague-Dawley patkányokat (Charles River Research Models and Services, Sulzfeld, Baden-Württemberg, Németország) használtunk.

3.2. Felhasznált anyagok

Akut peritonitisz kiváltásához 1 ml komplett Freund adjuvánst (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA), az autofágia gátlásához bafilomycin A1-et (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) injektáltunk az állatok hasüregébe.

3.3. *In vivo* vizsgálatok

A mesothel sejtek vizsgálatához a Freund adjuváns kezelést követően különböző időpontokban (3, 5, 8, 11 nap) izolált mesenterium preparátumokat használtunk. Kontrollként a kezeletlen állatokból származó hashártya preparátumokat alkalmaztuk.

3.4. *In vitro* vizsgálatok

In vitro kísérleteinkhez a kontroll patkányokból kinyert hashártyákat steril körülmények között, DMEM/F12 tenyésztői médiumban tartottuk, és 1 ng/ml GM-CSF-fel (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) kezeltük. Néhány esetben a primer kultúrákat 80 μ M dynasore-ral (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) előkezeltük, a dinamin-függő endocitotikus útvonalak gátlása céljából.

3.5. Morfológiai, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok

3.5.1. A hashártya fixálása, előkészítése

A hashártya preparátumokat 2%-os glutáraldehid és 2%-os ozmium-tetroxid 1:1 arányú keverékével fixáltuk, kakodilát pufferrel mostuk, majd a mesenterium környéki zsírszövetet eltávolítottuk. A mosások után mintáinkat felszálló alkoholsorral víztelenítettük, és aralditba ágyasztuk. Fénymikroszkópos vizsgálatainkhoz a beágyazott mintáinkból Reichert ultrakriomikrotómmal félvékony metszeteket készítettünk, amelyeket azután toluidinkékkel festettünk, hagyományos fénymikroszkóppal (Carl Zeiss) vizsgáltunk, Zeiss Axiocam HRc kamerával fotóztunk, és Axiovision programmal analizáltunk. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket uranil-acetáttal és ólom(II)-nitráttal kontrasztoltunk, majd Hitachi H-7600-as transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltunk.

3.5.2. Elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok

Immuncitokémiai vizsgálatainkhoz mintáinkat 1%-os PFA-ban fixáltuk, majd a mosások után zselatinba ágyasztuk. A blokkokat krioprotekció céljából 2,3 M-os cukor oldatban inkubáltuk, majd alumínium pinekre kitapasztattuk, és folyékony nitrogénben lefagyasztva tároltuk. A fagyasztott ultravékony (70 nm) metszeteket Leica Ultracut S fagyasztó ultramikrotómmal készítettük. A metszeteket glicines-PBS-el mostuk, majd 1%-os BSA-PBS-el blokkoltuk, és 1 órán keresztül inkubáltuk anti-GM-CSFR β antitesttel. A kettős-jelölésekhez anti-EEA1-et és anti-Rab7-et használtunk második ellenanyagként. A GM-CSFR β kimutatására

10 nm-es kolloidális arannyal konjugált protein A-t (PAG10) használtunk, míg az EEA1-et és a Rab7-et 15 nm-es kolloidális arannyal konjugált protein A (PAG15) használatával tettük láthatóvá. A 2%-os uranil-acetáttal történő kontrasztosítás után a metszeteket 1,8%-os metilcellulóz és 0,4%-os uranil-acetát elegyében inkubáltuk. Az elkészült metszeteket Hitachi H-7600-as transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6. Konfokális mikroszkópia

3.6.1. A minta előkészítése konfokális immuncitokémiai vizsgálatokhoz

Az immun fluoreszcens jelölések menetét a módosított Tokuyashu-technika szerint végeztük. A PFA-ben fixált mintákat mostuk, és 10%-os zselatinba ágyztuk (30 perc, 37°C), majd apró blokkokat formáltunk. Krioprotekció céljából blokkjainkat egy éjszakára 2,3 M-os cukoroldatban inkubáltuk (4°C), majd alumínium pinekre kitapasztattuk, és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A zselatinos blokkokból Leica fagyasztó ultramikrotómmal 0,6 µm vastagságú metszeteket készítettünk.

3.6.2. A fluoreszcens immunjelölések menete és kiértékelése

Félvékony metszeteinket glicines-PBS-sel mostuk, majd 1%-os BSA-PBS-el blokkoltuk. Ezután a metszeteket az adott primer ellenanyagokkal egy éjszakán át inkubáltuk (4°C), majd a megfelelő, fajspecifikus Alexa Fluor IgG fluoreszcens festékkel konjugált ellenanyagokat (Alexa Fluor 488) használtuk (1 óra, sötét), hogy láthatóvá tegyük a primer antitesteket. Kettős-jelölések esetén a

metszeteket újramostuk glicines-PBS-sel, blokkoltuk 1%-os BSA-PBS-el, és az említett lépéseket ismételtük a megfelelő szekunder antitestek, és az azokra specifikus Alexa festékek (Alexa Fluor 555) használatával. A sejtmagok megfestéséhez Vectashield DAPI-t használtunk. Az elkészült metszeteket Zeiss LSM-780 (Carl Zeiss Technika Kft., Budaörs, Magyarország) konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk, és ZEN programmal analizáltuk. A képeket aztán Adobe Photoshop 7.1 szoftver alkalmazásával dolgoztuk fel.

3.7. Statisztikai analízis

Immuncitokémiai vizsgálatainkat statisztikai mérésekkel támasztottuk alá. A különböző markerek kolokalizációjának megállapítása céljából minden vizsgálati csoportban 12 mesothel sejtet elemeztünk ZEN program segítségével. A kapott korrelációs együtthatók adatait leíró statisztikával elemeztük. Az összes eredményt átlag \pm szórás (SD) értéként adtuk meg.

3.8. Biokémiai vizsgálatok

3.8.1. Mesothel sejtlizátum, citoplazma és magfrakció izolálása

A kontroll és a Freund adjuvánssal injektált állatok hasüregét PBS-sel átmostuk, majd az izolált hashártyákat 0,2%-os kollagenázban (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA), termosztátban inkubáltuk. A kollagenázos emésztés után a mintákat centrifugálás közbeiktatásával (1000 rpm, 3 x 10 perc, 4°C) mostuk, majd a felhasználásig -80°C-on tároltuk. Az izolált mesothel sejtlizátumokat lízis pufferben tártuk fel, majd centrifugáltuk (12000

rpm, 20 perc, 4°C). A felülúszó (mesothel sejtlizátum) fehérjetartalmát a BCA-módszer segítségével meghatároztuk, és a mintákat 2 mg/ml koncentrációra hígítottuk. A citoplazma és sejtmag frakciójának izolálásához a mesothel sejtek lizátumát 1000, majd 2000 rpm-el centrifugáltuk, a csapadékot 500 µl hipotóniás pufferrel felfuszpendáltuk, majd a mintákhoz 25 µl detergenst (10% Nonidet P-40) adtunk. Centrifugálás után a felúszót (citoplazma frakció) összegyűjtöttük, és -80°C-on tároltuk. A pelletet (későbbi magfrakció) 50 µl teljes sejt-extrakciós pufferben (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) felfuszpendáltuk, 30 percig jégen inkubáltuk. Centrifugálás után (14000 g) a felúszót (sejtmagfrakció) -80°C-on tároltuk. A két frakció fehérjetartalmát a BCA módszer segítségével határoztuk meg, majd a mintákat 2 mg/ml koncentrációra hígítottuk.

3.8.2. *A Western blot vizsgálat*

A mintákhoz Tris-SDS puffert adtunk (1:1 arányban), és 4 percen át forraltuk. Ezt követően a fehérjéket elektroforézis útján elválasztottuk (10%-os poliakrilamid gél, 200 V, 30-40 perc). A fehérjék nitrocellulóz membránra való transzferjéhez a gélt és a membránt blot pufferben, folyamatos hűtés mellett 1 órán át 100 V-on blottoltuk. Ezután a membránokat 0,0005%-os Tween-PBS pufferben mostuk, majd a fehérjefrakciók pillanatnyi láthatóvá tétele miatt Ponceau S (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) oldattal kezeltük. Ezek után a membránokat 5%-os, sovány tejpörrel blokkoltuk, mostuk, majd a primer antitestekkel egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. Töltési kontrollként β -tubulin, β -aktin és lamin A

antitesteket alkalmaztunk. A primer ellenanyagok láthatóvá tételéhez a membránokat specifikus, peroxidáz-konjugált, szekunder antitestekkel (Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA) 2 órán keresztül inkubáltuk. A jelölt-fehérjék detektálásához a membránokat kemolumineszcens oldattal (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, USA) kezeltük, majd az immunreakciót röntgenfilm, illetve LI-COR C-Digit Blot scanner segítségével detektáltuk. A kapott Western blot adatok kiértékeléséhez a relatív denzitásokat 3 független mérés eredményéből ImageJ program segítségével határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. A GM-CSFR β internalizációjának immuncitokémiai és kvantitatív vizsgálata mesothel sejtekben

4.1.1. A GM-CSFR β expressziója és internalizációja: a caveolin-mediált endocitózis vizsgálata in vivo és in vitro

Munkánk során igazoltuk, hogy a GM-CSFR β expressziója a Freund adjuváns kezelés hatására jelentősen megnő a mesothel sejtekben, a gyulladás indukcióját követő 5. nap után azonban fokozatosan csökken.

Morfológiai és statisztikai kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a GM-CSFR β internalizációja caveolák közreműködésével megy végbe.

4.1.2. Az internalizált GM-CSFR β útja a korai endoszómák felé

Fél- és ultravékony metszeteken elvégzett kettős jelöléses immuncitokémiai vizsgálataink és statisztikai elemzéseink egyértelműen azt mutatták, hogy a gyulladás előrehaladtával a GM-CSFR β egyre nagyobb mennyiségben mutatható ki EEA1-pozitív korai endoszómákban. A gyulladás 3. napján számos korai endoszóma membránjában figyelhető meg a GM-CSFR β . Ezek az eredmények egyértelműen azt igazolják, hogy az internalizált receptor a caveolákból korai endoszómákba szállítódik.

4.1.3. A GM-CSFR β további sorsa: reciklizáció vagy lebontás?

Eredményeink azt mutatták, hogy amíg a gyulladás fennáll, a receptor Rab11a-pozitív reciklizáló endoszómákban van jelen a mesothel sejtekben, jelezvén, hogy jelentős mennyiségű receptor kerül vissza ekkor a plazmamembránra, amelyek egy újabb

endocitotikus ciklusban vehetnek részt, fenntartva ezzel az EMT folyamatát. Az idő előrehaladtával és a gyógyulás megindulásával azonban a receptor egyre inkább Rab7-pozitív késői endoszómákban detektálható, jelezvén, hogy megindul a GM-CSFR β lizoszómális degradációja.

4.2. Jelátvitel az EMT és a MET során: a STAT5 aktiválódása

Immuncitokémiai és Western blot eredményeink azt mutatták, hogy a STAT5 kis mennyiségben már a kontroll mesothel sejtekben is foszforilálódik tirozin aminosaván (p-STAT5). Ezen aktív forma expressziója jelentősen megnő a gyulladás 3. napján, és nagy mennyiségben detektálható a sejtek citoplazma és magfrakciójában is. Az 5. napon a p-STAT5 expressziós szintje mérséklődik, majd a regeneráció előrehaladtával (8. és 11. nap) drasztikusan csökken, és csak a mesothel sejtek sejtmagjában mutatható ki kis mennyiségben.

Ha a GM-CSFR β dinamin-függő endocitózist dynasore kezeléssel gátoljuk, a mesothel sejtekben nem detektálható aktív, p-STAT5. Ezek az eredmények egyértelműen azt igazolják, hogy a GM-CSF jelátviteléhez a receptor β alegységének internalizációja elengedhetetlenül szükséges.

4.3. A SOCS1 expressziós vizsgálata

Immuncitokémiai eredményeink igazolták, hogy a kontroll és kezelt mesothel sejtekben is expresszálódik a SOCS1, eloszlása diffúz. A gyulladás 3. napján expressziója azonban csökken,

jelelvén, hogy a SOCS1 GM-CSF jelátvitelt gátló hatása csökken, és a JAK2-mediált STAT5 foszforiláció végbemehet.

4.4. Az autofágia vizsgálata

4.4.1. Az Akt és az mTOR aktivációja

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a gyulladás 3. napján a foszforilált Akt szintje eléri a maximumot, amelynek eredményeként a p-mTOR expressziója is jelentősen megnő, igazolva, hogy a progresszív gyulladás ideje alatt a jelentős mértékben expresszálódó aktív p-Akt és p-mTOR a mesothel sejtekben gátlás alatt tartják az autofágiát. A gyulladás csúcspontja után azonban a p-Akt, és ennek következtében a p-mTOR expressziója is drasztikusan lecsökken, így az autofágia felszabadulva a gátlás alól beindíthatja a feleslegessé vált sejtalkotók, fehérjék intenzív lebontását.

4.4.2. A Beclin-1 és az LC3B expressziója

A gyulladás korai stádiumában (3. nap) a Beclin-1 expressziója szignifikánsan megemelkedik, majd a 8. naptól kezdve fokozatosan csökken, jelelvén, hogy az autofágia indukálásához az egyik szükséges faktor jelen van a rendszerünkben.

Az autofág sejtalkotók egyik fontos membrán markere az LC3B. Biokémiai vizsgálataink eredményei egyértelműen azt mutatták, hogy a membránhoz kötött LC3B mennyisége a regeneráció előrehaladtával fokozatosan csökken, jelelvén, hogy az autofagoszómák belső membránjához kötött LC3B molekulák is lebontásra kerülnek a progresszív autofágiával.

4.5. A BMP fehérjék és receptoruk expressziójának vizsgálata a mesothel sejtekben

Biokémiai vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a MET-et indukáló BMP4 már a gyulladás 3. napján jelentős mennyiségben expresszálódik a mesothel sejtekben. Maximumát az 5. napon éri el, majd a gyógyulás beindulásával szintje kissé ugyan csökken, de a mesothel sejtek még a 11. napon is expresszálják. A kontroll mesothel sejtek csekély mennyiségben expresszálják a BMP ligand-specifikus receptorát, a BMPRII-t. A Freund adjuváns kezelést követően a receptor expressziója azonban fokozatosan nő egészen a regeneráció végéig.

4.7. A bafilomycin A1 hatásának vizsgálata a mesothel sejtek regenerációjára

Mind fény-, mind pedig elektronmikroszkópos vizsgálataink azt mutatták, hogy a bafilomycin kezelés önmagában nincs hatással a mesothel sejtek morfológiájára. A Freund adjuváns injektálását követő 3. és 5. napon vizsgált, bafilomycin kezelést is kapott állatok mesothel sejtjei az idő előrehaladtával azonban egyre jobban mutatják az apoptózisra jellemző morfológiai elváltozásokat. A Freund adjuváns injektálást követő 8. napon, az egyszeres és a kombinált bafilomycin kezelést kapott csoportok mindegyikénél egyértelműen látható volt, hogy a mesothel sejtek az autofágia gátlásával apoptózis útján elpusztulnak. Ezek az eredmények egyértelműen igazolják, hogy a gyulladást követő regeneráció autofágia nélkül nem megy végbe.

5. Következtetések

- ❖ Kísérleteink során bebizonyítottuk, hogy a patkány hashártya mesothel sejtjei expresszálják a GM-CSF jelátvitelben szignál transzdukcióért felelős GM-CSFR β alegységét. Expressziója a gyulladás alatt szignifikánsan megnő.
- ❖ A GM-CSFR β internalizációja elengedhetetlen feltétele a jelátviteli folyamatok beindulásának. A GM-CSFR β caveolin-mediált endocitózis útján internalizálódik a mesothel sejtekben, és a klasszikus korai-késői endoszóma, lizoszóma útvonalat követi.
- ❖ A korai endoszómákban lehetővé válik a JAK2-mediált STAT5 tirozinon való foszforilációja. A GM-CSFR β dinamin-függő endocitózisának blokkolása gátolja a STAT5 foszforilációját, így a jelátvitelt is; egyértelműen igazolva, hogy a GM-CSFR β internalizációja nélkül a jelátviteli folyamatok nem aktiválódnak és nem mennek végbe.
- ❖ Amíg a gyulladás fennáll, jelentős a GM-CSFR β reciklizációja a plazmamembránra, így képes fenntartani az EMT-t indukáló jelátviteli mechanizmusokat.
- ❖ A gyulladás lecsengésével és a gyógyulás megindulásával a GM-CSFR β késői endoszómákban detektálható, és a lizoszómákkal való fúzió után lebomlik. Ha a jelet közvetítő receptor β degradálódik, megindulhat a mesothel sejtek regenerációja (MET).

- ❖ Igazoltuk, hogy a GM-CSF jelátvitel negatív visszacsatolását és leállítását végző SOCS1 regulátor fehérje a mesothel sejtekben expresszálódik.
- ❖ Igazoltuk, hogy a mesothel sejtek regenerációja autofágiával megy végbe. Az autofágia folyamatában közvetlen szerepet játszó Beclin-1 és LC3B expressziója az autofágia dinamikájának megfelelően változik.
- ❖ A gyulladás korai időpontjaiban az autofágia negatív regulátorainak (p-Akt, p-mTOR) fokozott expressziója gátlás alatt tartja az autofág folyamatokat. A gyulladás csúcspontja után azonban a p-Akt és a p-mTOR inaktiválódnak, az autofágia felszabadul a gátlás alól, és beindulhat a mesothel sejtek regenerációja.
- ❖ A mesothel sejtek gyógyulását (MET) a BMP faktorok is elősegítik. A mesothel sejtek már a gyulladás korai időpontjában expresszálják a BMP4-et, amely a BMPR2 jelenlétében feltehetően egy auto/parakrin szabályozás révén kompenzálja az EMT-t, és indukálja a MET folyamatát. A BMP7-et a mesothel sejtek nem expresszálják, de a hasüregben jelen van, és mennyisége fokozatosan nő az idő előrehaladtával.
- ❖ A gyulladás különböző napjaiban bafilomycinnel kezelt állatok mesothel sejtjei nem képesek a regenerációra, és apoptózissal elpusztulnak, amely egyértelműen igazolja, hogy az autofágia valóban nélkülözhetetlen a mesothel sejtek gyulladás utáni regenerációjában (MET).

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló, a disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- ❖ **Zsiros V**, Katz S, Dóczy N, Kiss AL. (2017) Autophagy is the key process in the re-establishment of the epitheloid phenotype during mesenchymal-epithelial transition (MET). *Exp Cell Res*, 352: 382-392. (IF: 3,309)
- ❖ Katz S, **Zsiros V**, Dóczy N, Szabó A, Biczó Á, Kiss AL. (2016) GM-CSF and GM-CSF receptor have regulatory role in transforming rat mesenteric mesothelial cells into macrophage-like cells. *Inflamm Res*, 65: 827-836. (IF: 2,659)
- ❖ Katz S, **Zsiros V**, Dóczy N, Kiss AL. (2018) Inflammation-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and GM-CSF Treatment Stimulate Mesenteric Mesothelial Cells to Transdifferentiate into Macrophages. *Inflammation*, 41: 1825-1834. (IF: 2,884)

6.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó, attól független publikációk:

- ❖ Magyar M, **Zsiros V**, Kiss AL, Nagy ZZ, Szepessy Z. (2019) Caveolák szerepe a szürke hályog képződésében: humán szemlencse epithelsejtjeinek vizsgálata. *Orv Hetil*, 160: 300-308. (IF: 0,322)