

# A GM-CSF receptor $\beta$ internalizációjának és az autofágiának a szerepe az EMT és a MET szabályozásában

Doktori értekezés

**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. Lőw 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

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b> .....	4
<b>2. Bevezetés</b> .....	7
<b>2.1. A sokoldalú mesothelium</b> .....	7
2.1.1. <i>A mesothelium fogalma, története és eredete</i> .....	7
2.1.2. <i>A mesothelium morfológiája, a mesothel sejtek jellegzetességei</i> .....	8
2.1.3. <i>A mesothelium funkciója, klinikai jelentősége</i> .....	9
<b>2.2. Az epitheliális-mesenchymális (EMT), illetve a mesenchymális-epitheliális átalakulás (MET)</b> .....	10
2.2.1. <i>Az EMT-MET meghatározása, története, általános funkciói</i> .....	10
2.2.2. <i>Az EMT folyamatainak osztályozása</i> .....	12
2.2.3. <i>Az EMT során lejátszódó legfontosabb celluláris változások</i> .....	14
2.2.4. <i>Az EMT-MET indukciója, molekuláris háttere</i> .....	17
<b>2.3. A kolónia-stimuláló faktorok</b> .....	28
2.3.1. <i>A kolónia-stimuláló faktorok felfedezése</i> .....	28
2.3.2. <i>A kolónia-stimuláló faktorok csoportosítása, funkciója, jellemzői</i> .....	28
<b>2.4. A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF)</b> .....	30
2.4.1. <i>A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) felfedezése</i> ....	30
2.4.2. <i>A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) bemutatása</i> ..	30
2.4.3. <i>A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor receptorok (GM-CSFR)</i> .	32
2.4.4. <i>A GM-CSF és receptora által szabályozott jelátviteli útvonalak</i> .....	34
<b>2.5. Az autofágia</b> .....	37
2.5.1. <i>Az autofágia rövid története, bemutatása</i> .....	37
2.5.2. <i>Az autofág folyamatok osztályozása</i> .....	38
2.5.3. <i>A makroautofágia folyamatának lépései és markerei</i> .....	40
<b>3. Célkitűzések</b> .....	45

<b>4. Módszerek</b> .....	48
<b>4.1. Állatok</b> .....	48
<b>4.2. Felhasznált anyagok</b> .....	48
<b>4.3. A kísérleteink során használt ellenanyagok</b> .....	49
<b>4.4. <i>In vivo</i> vizsgálatok</b> .....	52
<b>4.5. <i>In vitro</i> vizsgálatok</b> .....	52
<b>4.6. Morfológiai, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok</b> .....	53
4.6.1. <i>A hashártya fixálása, előkészítése</i> .....	53
4.6.2. <i>Elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok</i> .....	53
<b>4.7. Konfokális mikroszkópia</b> .....	55
4.7.1. <i>A minta fixálása, beágyazása konfokális immuncitokémiai vizsgálatokhoz</i> .	55
4.7.2. <i>Az immunjelölések menete és kiértékelése</i> .....	55
<b>4.8. Statisztikai analízis</b> .....	56
<b>4.9. Biokémiai vizsgálatok</b> .....	57
4.9.1. <i>Mesothel sejtlizátum, citoplazma és magfrakció izolálása</i> .....	57
4.9.2. <i>Western blot vizsgálat menete</i> .....	58
<b>5. Eredmények</b> .....	60
<b>5.1. A GM-CSF receptor <math>\beta</math> internalizációjának vizsgálata mesothel sejtekben</b> ..	60
5.1.1. <i>A GM-CSFR <math>\beta</math> expressziója és internalizációja: a caveolin-mediált endocitózis vizsgálata in vivo és in vitro rendszerben</i> .....	60
5.1.2. <i>Az internalizált GM-CSF receptor <math>\beta</math> útja a korai endoszómák felé</i> .....	63
5.1.3. <i>A GM-CSF receptor <math>\beta</math> további sorsa: reciklizáció vagy lebontás?</i> .....	67
<b>5.2. A GM-CSF receptor <math>\beta</math> és az endocitotikus markerek kolokalizációjának kvantitatív vizsgálata</b> .....	73
<b>5.3. Jelátvitel az EMT és a MET során: a STAT5 aktiválódása</b> .....	75
<b>5.4. A SOCS1 expressziós vizsgálata</b> .....	78

<b>5.5. Az autofágia molekuláris háttere .....</b>	<b>80</b>
5.5.1. <i>Az Akt aktivációja .....</i>	80
5.5.2. <i>Az mTOR aktivációja.....</i>	82
5.5.3. <i>Az autofágia közvetlen szereplői: a Beclin-1 és az LC3B expressziója .....</i>	85
5.5.4. <i>Az endocitózis szerepének vizsgálata korai és késői endoszómális markerekkel .....</i>	88
<b>5.6. A BMP fehérjék szerepe a mesothel sejtek regenerációjában (MET) .....</b>	<b>92</b>
<b>5.7. A bafilomycin A1 hatása a mesothel sejtek regenerációjára .....</b>	<b>97</b>
5.7.1. <i>A bafilomycin A1 hatásának vizsgálata fénymikroszkópiával.....</i>	97
5.7.2. <i>A bafilomycin A1 hatásának elektronmikroszkópos vizsgálata.....</i>	100
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>108</b>
<b>7. Következtetések .....</b>	<b>125</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>127</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>128</b>
<b>10. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>129</b>
<b>11. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>145</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>146</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

<b>AL</b>	autolizoszóma (AutoLysosome)
<b>Atg</b>	autofágia-kapcsolt fehérje (AuTophagy-related protein)
<b>Au</b>	arany (AUrum)
<b>AV</b>	autofág vakuólum (Autophagic Vacuole)
<b>BMP</b>	csont morfogenetikus protein (Bone Morphogenetic Protein)
<b>BMPR</b>	csont morfogenetikus protein receptor (Bone Morphogenetic Protein Receptor)
<b>BSA</b>	marha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
<b>Co-Smad</b>	közös, mediátor Smad (COmmon-mediator Smad )
<b>D</b>	nap (Day)
<b>E-cadherin</b>	epitheliális, kalcium-függő sejtadhéziós fehérje (Epithelial-cadherin, calcium-dependent adhesion)
<b>ECM</b>	extracelluláris mátrix (ExtraCellular Matrix)
<b>EEA1</b>	korai endoszóma antigén-1 (Early Endosome Antigen-1)
<b>EMT</b>	epitheliális-mesenchymális átalakulás (Epithelial-Mesenchymal Transition)
<b>EGF</b>	epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor)
<b>ERK1/2</b>	extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2)
<b>FGF</b>	fibroblaszt növekedési faktor (Fibroblast Growth Factor)
<b>GM-CSF</b>	granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (Granulocyta-Macrophage Colony-Stimulating Factor)

<b>GM-CSFR</b>	granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor receptor (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor)
<b>HGF</b>	hepatocita növekedési faktor (Hepatocyte Growth Factor)
<b>IC</b>	immuncitokémia (ImmunoCytochemistry)
<b>IGF-1</b>	inzulin-szerű növekedési faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1)
<b>IL</b>	interleukin (InterLeukin)
<b>I-Smad</b>	gátló Smad (Inhibitory Smad)
<b>JAK</b>	Janus kináz (JAnus Kinase)
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminális kináz (c-Jun N-terminal Kinase)
<b>LC3B</b>	mikrotubulus-asszociált fehérje 1A/1B könnyű lánc 3B (microtubule-associated proteins 1A/1B Light Chain 3B)
<b>MAP</b>	mitogén-aktivált protein (Mitogen-Activated Protein)
<b>MET</b>	mesenchymális-epitheliális átalakulás (Mesenchymal-Epithelial Transition)
<b>MMP</b>	mátrix metalloproteináz (Matrix MetalloProteinase)
<b>MVB</b>	multivezikuláris test (MultiVesicular Body)
<b>mTOR</b>	mechanikai/emlős rapamycin célfehérje (Mechanistic/Mammalian Target Of Rapamycin)
<b>N-cadherin</b>	neurális, kalcium-függő sejtadhéziós fehérje (Neural-cadherin, calcium-dependent adhesion)
<b>NF-κB</b>	nukleáris faktor kappa B (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
<b>PALS1</b>	Lin-7 asszociált fehérje 1 (Protein Associated with Lin-7 1)

<b>PAR complex</b>	elválasztó-defektív komplex (PARTitioning-defective complex)
<b>PATJ</b>	PALS1-asszociált sejtkapcsoló fehérje (PALS1-Associated Tight-Junction protein)
<b>PBS</b>	foszfáttal pufferelt sóoldat (Phosphate-Buffered Saline)
<b>PI3K</b>	foszfatidil-inozitol-3-kináz (Phosphatidylinositol-3-Kinase)
<b>PKB/Akt</b>	protein kináz B (Protein Kinase B)
<b>Rabs</b>	Ras-rokon fehérjék (RAS-like proteins from rat Brain)
<b>R-Smad</b>	receptor-regulált Smad (Receptor-regulated Smad)
<b>Ser</b>	szerin (Serine)
<b>SOCS</b>	citokin jelátvitel gátló 1 (Suppressor of Cytokine Signaling)
<b>STAT</b>	jelátalakító és aktiváló transzkripciós faktor (Signal Transducer and Activator of Transcription)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transzformáló növekedési faktor béta (Transforming Growth Factor- $\beta$ )
<b>TGF-<math>\beta</math>R</b>	transzformáló növekedési faktor béta receptor (Transforming Growth Factor- $\beta$ Receptor)
<b>Thr</b>	treonin (Threonine)
<b>TIMP</b>	metalloproteinázok szöveti gátló fehérje (Tissue Inhibitor of MetalloProteinases)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	tumor nekrozis faktor alfa (Tumor Necrosis Factor $\alpha$ )
<b>Tyr</b>	tirozin (Tyrosine)

## 2. Bevezetés

### 2.1. A sokoldalú mesothelium

#### 2.1.1. A mesothelium fogalma, története és eredete

A mesothelium a test savós üregeit (pleurális, perikardiális és peritoneális üregek) és belső szerveit borító savós hártya egyrétegű laphám sejtekből álló rétege (1, 2). A belső szerveket fedő hámréteget viscerális mesotheliumnak, míg a savós üregeket bélelőt parietális mesotheliumnak nevezzük (1). Az eredeti elképzelés szerint ez a hámréteg csakis védő felületként funkcionál, kizárólagos feladata a különböző felszínek sikamlóssá tétele, egy csúszós, nem-tapadó hámfelület biztosítása a testüregen belüli mozgások elősegítése érdekében. Mára azonban kiderült, hogy a mesothelium egy dinamikus sejtes membrán, amely számos élettani folyamatban játszik/játszhat szerepet (1, 3). A mesotheliumot elsőként (1827) Bichat írta le, aki szövettani technikák segítségével figyelte meg, hogy a savós üregeket egy lapos sejtek által formált egyrétegű hám béleli. A mesothelium elnevezés Minot-tól származik, aki részletes embriológiai vizsgálatait után (1880) mint „epitheliális bélelése a mesodermikus-üregeknek” tett említést erről a hámbélelésről (1). A mesothelium kifejezés ezen hámréteg mesodermális eredetére, és az epitheliumra emlékeztető morfológiájára utal (4). Ez a különleges hámréteg fajtól függően a terhesség 8. és 18. napja között fejlődik ki a mesodermából, emberben a 14. nap környékén (1). A kezdetben kerekded, kocka alakú mesodermális sejtek, amelyek rétegződése többmagsoros hám benyomását keltheti, három igen fontos fejlődési folyamaton mennek keresztül: a hámréteg alatt kialakul a bazális membrán, amely barriert képez a későbbi mesothelium és az alatta lévő mesenchyma között; a sejtek között megjelennek a sejtkapcsoló struktúrák; és a kocka alakú sejtek ellaposodnak, laphám sejtekké differenciálódnak (5). E három jelentős folyamat sorrendje fajonként más és más. Patkányban például már a kerekded sejtek között megjelennek sejtkapcsoló struktúrák, egérben azonban a sejtkapcsolatok csak az ellapult, mikrovillusokat növesztett sejteknél alakulnak ki (5). Számos emlős faj - beleértve humán mintákat is - mesotheliumának összehasonlítása során végzett morfológiai és hisztokémiai tanulmányok igazolták, hogy a mesothelium fajtól és anatómiai elhelyezkedésétől függetlenül igen jellegzetes és nagyfokú hasonlóságot mutat (1).



### 2.1.2. *A mesothelium morfológiája, a mesothel sejtek jellegzetességei*

A savós hárttyák mesothel sejtei egy kötőszövetes stroma által alátámasztott vékony bazális membránon helyezkednek el, egy sejtréteget formálva. Anatómiai elhelyezkedésüktől függően a mesothel sejtek lehetnek laposak vagy köbös hámsejtek, sőt a kettő közötti, intermedier forma is előfordulhat (6). A gyomor peritoneumában leginkább alacsony köbhám sejteket találunk, míg az úgynevezett parenchymás szervek (máj, lép) felszínén inkább köbös, kocka alakú mesothel sejteket figyelhetünk meg, amelyek citoplazmája gazdag sejtorganellumokban, bazális invaginációkkal és bonyolult intercelluláris kapcsolatokkal rendelkeznek (6). A bél területén, az omentális és a parietális hashártya mentén a jellegzetes, lapos mesothel sejt formát találjuk (6). Ezen lapos mesothel sejtek átmérője megközelítőleg 25 µm, citoplazmájukban csak a kerek, ovális vagy időnként elnyújtott, hosszúkásabb sejtmag dominál (2, 6). A sejtmagon kívül vezikulák és vakuólumok, kevés mitokondrium, szegényes Golgi-apparátus és csekély durva felszínű endoplazmatikus retikulum (dER), mikrotubulusok és intermedier filamentumok figyelhetők meg még bennük (2). Külön kiemelendő, hogy a mesothel sejteknek mind az apikális, mind a bazális plazmamembránján számos omega, illetve palack alakú befűződés, úgynevezett caveola figyelhető meg, amelyek amellet, hogy alternatív endocitotikus útvonalat biztosítanak a különböző molekulák felvételéhez, számos egyéb, például jelátviteli folyamatokat szabályozó funkcióval is bírnak (7–9). Regenerációs képessége alapján ez a laphámréteg egy lassan megújuló szövet, a mesothel sejteknek körülbelül csak a 0,16-0,5%-a megy keresztül a mitózison minden egyes sejtciklus alatt (2).

Elektronmikroszkópos vizsgálatokkal a mesothel sejtek lumen felé néző apikális felszínén néhány esetben primer csillót, s olykor jól fejlett mikrovillusokat is láthatunk, amelyek sűrűsége, hossza, és alakja eltérő (1). A különböző belső szervek felszínét borító mesothel sejteken a mikrobolyhok sűrűsége, száma igen varibális, de még a szomszédos sejtek között is eltérő lehet, sőt az élettani és fiziológiás körülmények megváltozásával is változik (10). Vannak olyan adatok, amelyek azt sugallják, hogy a regenerálódó mesothel sejtek mikrobolyhainak számbeli különbségei tükrözhetik a sejtek adott funkcióhoz való adaptációját is (1, 11).

A mesothelium sejtszei közötti határok kesze-kuszán kanyarognak, nem egyenesek, s emiatt a szomszédos sejtek a sejthatároknál részben egymást is fedhetik. A sejtek a

közöttük lévő, igen jól fejlett sejtkapcsoló struktúráik zonula occludens (tight junctions), zonula adherens, réskapcsolatok (gap junction) és dezmoszóma (macula adherens) révén (2) szorosan kapcsolódnak egymáshoz a bazális membrán felszínén. A mesothel sejtek között kialakult tight junction komplexek létfontosságúak, ezek alakítják ki a sejtfelszíni polaritást, biztosítják, hogy a mesothel féligáteresztő diffúziós barrierként működjön (2). A zonula adherens feltehetően az egy sejtréteg szerkezeti és adhéziós megtartásában játszanak nagyon fontos szerepet, a réskapcsolatok pedig intercelluláris csatornaként működnek (1).

### *2.1.3. A mesothelium funkciója, klinikai jelentősége*

A mesothelium egyik fő feladata az integritás és működés fenntartása a test üregeiben. A mesothel sejtek védelmet nyújtanak a behatoló kórokozók és a fizikai sérülések ellen, valamint olyan anyagokat szekretálnak (surfactant, glükózaminoglikánok, proteoglikánok), amelyek révén egy súrlódásmentes, csúszós felszínt tudnak biztosítani, lehetővé téve ezzel a belső szervek egymáson való elmozdulását (2). A mesothel sejtek azonban a védelmet nyújtó határfelület képzésén kívül még számos más funkcióval is bírnak. Részt vesznek például különböző anyagok transzportjában; antigén prezentációban; gyulladási folyamatokat képesek indukálni és szöveti regenerációt segítenek elő az általuk termelt különböző növekedési faktorok, citokinek, gyulladási mediátorok, proteázok, extracelluláris mátrix molekulák révén; de szerepet játszanak koagulációs folyamatokban, fibrinolízisben, és még tumoros sejtheadhézióban is (2, 12). A hasüregben kialakult sérülés hatására mesotheliális regeneráció indul be, amelynek során a mesothel sejtek képesek elvándorolni, a seb felületéhez kötődni, és elősegíteni a gyógyulási folyamatokat. Az említett folyamatok alatt lejátszódó sejtttranszformációs változások során azonban a sejtek sérülhetnek, károsodhatnak és rosszindulatú mesothelioma kialakulását eredményezhetik (2).

Bár morfológiailag a mesothel sejtek hasonlítanak a hámsejtekre, és számos epitheliális tulajdonsággal is rendelkeznek (apikális/bazális sejtpolaritás, citokeratin expresszió, felszíni mikrobolyhok, stb.), embrionálisan a mesodermából származnak, és mesenchymális mivoltuk révén expresszálnak mesodermális markereket (vimentin, desmin) is. Különböző stimulusok hatására számos morfológiai és funkcionális

változáson mennek keresztül, amelyek összessége megfeleltethető és jellemezhető az úgynevezett epitheliális-mesenchymális átalakulás (EMT) folyamatával (12, 13).

## **2.2. Az epitheliális-mesenchymális (EMT), illetve a mesenchymális-epitheliális átalakulás (MET)**

### *2.2.1. Az EMT-MET meghatározása, története, általános funkciói*

Az epitheliális-mesenchymális átalakulás (EMT) egy olyan biológiai folyamat, amely lehetővé teszi, hogy a polarizált epitheliális sejtek, amelyek bazális plazmamembránjaik révén rendszerint kölcsönhatásban vannak a bazális membránnal, biokémiai változások során mesenchymális fenotípusú sejtekké differenciálódnak (14). Ezen átalakulás közben a hámsejtek elveszítik polaritásukat, a szomszédos sejtekkel és a bazális membránnal való kapcsolataikat, átszerveződik a sejtíváz szerkezetük, és képesek lesznek a migrációra (15, 16). E fenotípusos konverzió mögött pedig az epitheliális sejtek molekuláris átprogramozása áll, amely rendszerint új biokémiai utasítások révén történik (15), s amelyek hatására megváltozik a sejtek génexpressziós mintázata (16). Ezen átalakulás során fokozódik a sejtek invazivitása, megnövekszik a rezisztenciája az apoptózissal szemben, valamint nagy mennyiségben kezdenek el extracelluláris mátrix (ECM) komponenseket termelni (14). A mesenchymális-epitheliális átalakulás (MET) ezzel szemben az EMT fordítottja, amelynek eredményeként a mesenchymális jellegű sejtek visszanyerik epitheliális tulajdonságaikat (17). Sok esetben a MET kiegyenlíti vagy éppen ellensúlyozza az EMT folyamatát, fenntartva ezzel egy úgynevezett „Ying-Yang” egyensúlyi állapotot a szervezetben (18).

A celluláris plaszticitást szabályozó EMT nevet többféleképpen is szokták használni. Az „átalakulás” elnevezésen kívül használatos még a „transzformáció”, az „interakció” és a „transzdifferentiáció” kifejezés is, amelyek használata óvatosságra int, hiszen nem ugyanazt jelentik (15). A „transzformáció” például az epithelium klasszikus értelemben vett tumoros átalakulását jelenti. Az „interakció” egy oda-vissza működő kapcsolatot ír le egy epitheliális és egy mesenchymális tulajdonságokkal rendelkező sejt között. A „differentiáció” szó használatos leginkább akkor, amikor egy őssejt-tulajdonságú vagy nem véglegesen differenciált sejt differenciálódik tovább valamilyen

irányban, míg a „transzdifferentiáció” egy már elviekben differenciált sejt átalakulását jelenti egy másik típusú sejtté (15). A későbbiekben majd látható, hogy mindezek alapján a mesothel sejteken végbemenő változásokat átalakulás, differenciáció és transzdifferentiáció néven is lehet említeni.

Az EMT folyamatát először 1982-ben Gary Greenburg és Elizabeth D. Hay írták le, amikor csirke embrióból származó hámsejteket kollagén tartalmú gélben vizsgálva észlelték, hogy az epitheliális sejtek elveszítik polaritásukat, leválnak a felszínről és képesek lesznek a migrációra (19). Ez volt az első olyan tanulmány, amely arról szólt, hogy az EMT létfontosságú folyamat a korai embrionális morfogenezis során (20). Mára már nyilvánvalóvá vált, hogy mind az EMT, mind a MET esszenciális biológiai folyamatok, és ismeretük rendkívüli jelentőséggel bír. Kulcsfontosságú szerepük van a sejtsors meghatározásában, a szöveti regenerációban, a sebgyógyulásban, a szervfibrozisban és a tumorok kialakulásában is (18). Kísérletes adatok bizonyítják például, hogy az átmeneti és a hosszantartó EMT különböző sebgyógyulási válaszokat indukál (21), vagy hogy az EMT révén keletkezett fibroblasztok indukált pluripotens őssejteké programozhatóak vissza a MET mechanizmusán keresztül, ha biztosítják az ideális extracelluláris körülményeket és a megfelelő transzkripciós faktorokat (22).

Az EMT és a MET szerepe a tumoros megbetegedések esetén sem kérdőjelezhető meg. Tumor progresszió során az EMT alatt végbemenő változások szükségesek ahhoz, hogy a transzformálódott tumor sejtek áthatolva a bazális membránon, és lebontva az extracelluláris mátrixot motilissé váljanak, és elhagyják a primer tumor helyét (23, 24). Mindez kell ahhoz, hogy invazív formát képezzenek, és belépjenek a nyirok- vagy a vérkeringésbe (23). A keringési rendszerben túlélő tumor sejtek extravazáció révén kitörnek az erek falából, és így különféle szövetekbe jutnak el (24). Metasztatikus daganat kialakításához viszont a transzformált sejteknek vissza kell nyerniük az epitheliális tulajdonságaikat ahhoz, hogy szekunder tumort hozzanak létre egy másik szövetben. Ezt a metastatikus formát pedig a MET mechanizmusa teszi lehetővé. Ez ad magyarázatot arra, hogy kórszövettanilag miért hasonlít egymásra a primer tumor és az áttétes forma (23). A metasztázis folyamata tehát magába foglalja mind az EMT révén kialakult tumor progresszióját, mind a transzformálódott sejtek áttétképzésének a folyamatát MET révén (25). Egy malignus tumor kialakulása végzetes lépést jelent a rákos megbetegedés progressziójában. A tumoros megbetegedésben elhunyt betegek

csaknem 90%-ában már metasztatikus formában volt jelen a daganat (23). Éppen ezért rendkívüli jelentőséggel bír, hogy minél hamarabb kezeljék a kialakult daganatos betegséget. Az EMT és a MET molekuláris hátterének pontos feltérképezése ebben nyújt segítséget, hiszen megismerésükkel talán hatékonyabb és célzottabb lehet a rákterápia, és megelőzhető lehet egy esetleges áttét kialakulása (23). A jelenlegi ismeretek alapján úgy tűnik, hogy a legjobb lehetőségek a sikeres gyógykezelésekre az úgynevezett hibrid, epitheliális/mesenchymális állapot között lévő tumoros sejtek célzott terápiája (26).

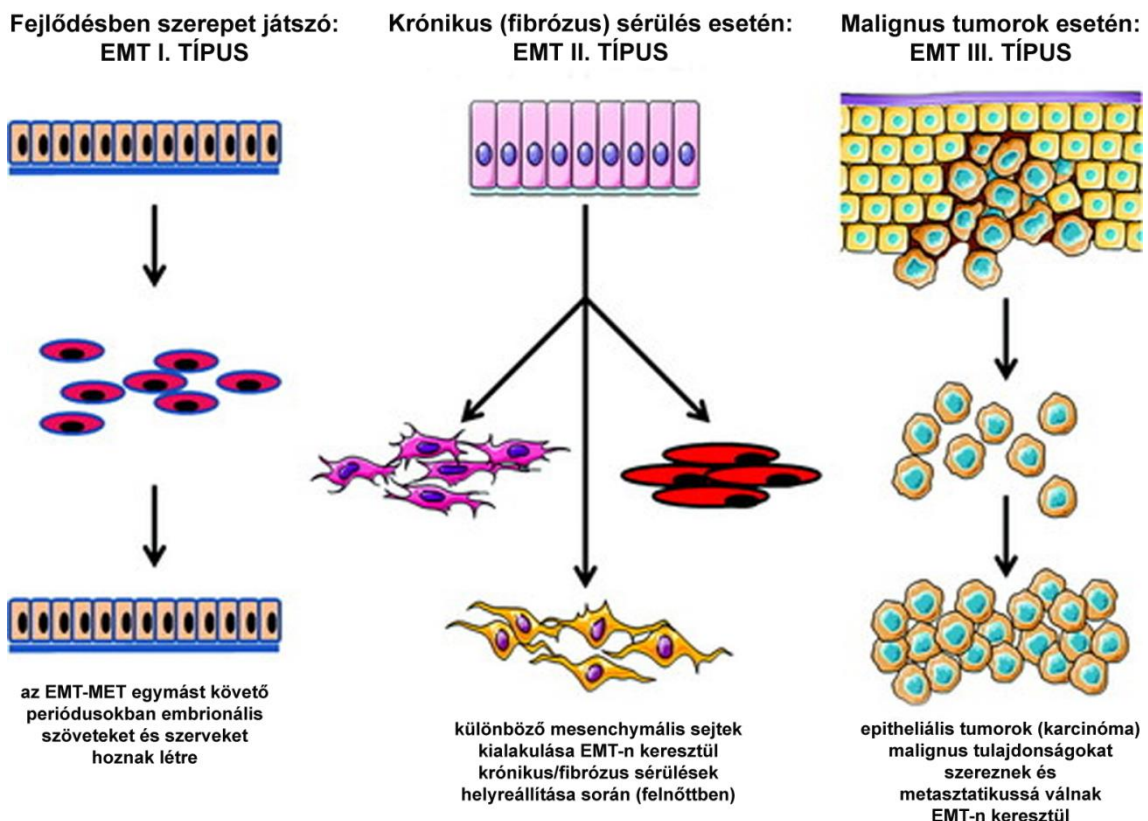
### 2.2.2. Az EMT folyamatainak osztályozása

Tekintettel arra, hogy az EMT számos folyamat kulcsfontosságú résztvevője háromféle típusát (I., II. és III.) különbözteti meg a szakirodalom, annak alapján, hogy mikor és milyen biológiai kontextusban játszik szerepet (14, 21, 27) (**1. ábra**). Az EMT e három különböző típusának besorolására vonatkozó javaslatot egy 2007-es lengyelországi EMT találkozón, és egy azt követő 2008 márciusában tartott ülésen vitatták meg a Cold Spring Harbor Laboratóriumban (14). A három típus kimenetele és végeredménye egyébként megegyezik, a lényeg, hogy egy klasszikusan epitheliális tulajdonságokkal rendelkező hámsejtből egy migrálni képes, mesenchymális fenotípusú sejt jöjjön létre (21).

❖ **EMT I:** Az első típus azokat az átalakulási folyamatokat foglalja magába, amelyek az embrionális morfogenezis és a szervfejlődés során játszódnak le. Ennek a típusnak kulcsszerepe van például a beágyazódás és a gasztruláció során, részt vesz a velőcső és a dúcléc sejtek kialakításában, a primer mesenchyma (mesoderma) létrejöttében.

Az embriogenezis során a MET-nek is alapvető szerepe van, hiszen például az epiblasztból (ektodermából) létrehozott elsődleges mesenchyma később MET révén alakítja ki a másodlagos epitheliumot, a hipoblasztot (endodermát). Feltételezhető, hogy az így kialakult másodlagos epithelium tovább differenciálódik, és egy újabb EMT lejátszódásával létrehoz különböző kötőszöveti sejteket (14).

- ❖ **EMT II.:** A második típusú EMT az előzővel ellentétben hosszabb idő alatt fejeződik ki, és főleg fibrózis során és gyulladásos körülmények között játszik kulcsfontosságú szerepet. Nélkülözhetetlen a szövetek regenerációjához és a sebgyógyuláshoz is (14). Munkám során a II. típusú EMT, és az azt követő MET molekuláris szabályozását, valamint ezek következményeként létrejövő morfológiai változásokat tanulmányoztam patkány hashártya mesothel sejtjein, ezért disszertációmban a későbbiekben az olvasó ezen folyamatok részleteivel ismerkedhet majd meg.
- ❖ **EMT III.:** Az EMT harmadik változata a daganatképződés során megy végbe, és lehetővé teszi a primer tumoros sejtek migrációját, lokális invázióját és intravazációját. Malignus daganatok kialakulásához, metasztázis képződéséhez ennek a reverz folyamata szükséges (MET), amely visszaállítja a tumor sejtek hám jellegét (14, 23).



**1. ábra. Az EMT típusainak osztályozása.** EMT az embriogenezis során (I. típus); EMT gyulladás, krónikus/fibrózus sérülések során (II. típus); EMT tumor kialakulása során (III. típus). (27).

### 2.2.3. Az EMT során lejátszódó legfontosabb celluláris változások

A hámsejtek az EMT összetett biológiai folyamata során számos morfológiai és molekuláris változáson mennek keresztül, amelynek eredményeként elveszítik hám tulajdonságaikat, és mesenchymális fenotípusú sejtekké alakulnak. Ezen folyamat során bekövetkező legfontosabb celluláris változások: **(2. ábra)**.

- ❖ **A hámsejtek alakja megváltozik, polarizáltságuk megszűnik, az apikális-bazolaterális polaritás teljesen eltűnik, helyébe elülső-hátulsó (anterior-posterior) irányultság kerül (28).**
  - ◆ Az emlős sejtek megkülönböztethető membrándoménjeit az úgynevezett polaritás-komplexek határozzák meg, amelyek funkcionálisan és fizikálisan is sejtkapcsoló struktúrákba szerveződnek. Az apikális felszínen az úgynevezett PAR komplexet alkotó PAR6, PAR3, és az atipikus proteín kináz C (aPKC); valamint a Crumbs komplexet létrehozó Crumbs (CRB), a Lin-7 asszociált proteín 1 (PALS1) és a PALS1-asszociált PATJ fehérjék kapcsolódnak a zonula occludensekhez, definiálva így az apikális membrándomént. A bazolaterális felszín meghatározásáért az úgynevezett Scribble komplex tagjai felelősek (scribble (SCRIB), lethal giant larvae (LGL), discs large (DLG) fehérjék), amelyek a zonula adherensekkel teremtenek kapcsolatot (28). Az EMT során ezek, a polaritást meghatározó markerek tűnnek el a sejtek felszínéről.
- ❖ **A sejtek a polaritás elvesztésével párhuzamosan felbontják az egymás közötti sejt-sejt (zonula occludens/tight junction, zonula adherens, dezmoszóma) kapcsolataikat (29).**
  - ◆ A hámsejtek apikális membránrészletéhez legközelebbi szoros sejtkapcsolatok (zonula occludens, tight junction) szétszerelődnek és eltűnnek (28). A tight junction kapcsolatok felbomlásával lehetővé válik az apikális és a basolaterális doménekre jellemző fehérjék keveredése a membrán mentén (30). Vannak arra utaló adatok, hogy a zonula occludensek jellemző fehérjéi, az occludin és a claudin-2 is az endocitózis clathrin- illetve caveolin-mediált formájával internalizálódnak például sebgyógyulás vagy citokinekkal előidézett gyulladásos körülmények esetén (31, 32). Az internalizáció folyamata azonban igen szelektív, a caveolin-1 csak az occludinnal és a claudin-2-vel lép kapcsolatba, a sejtkapcsolatban résztvevő másik két fehérjével (claudin-4 és

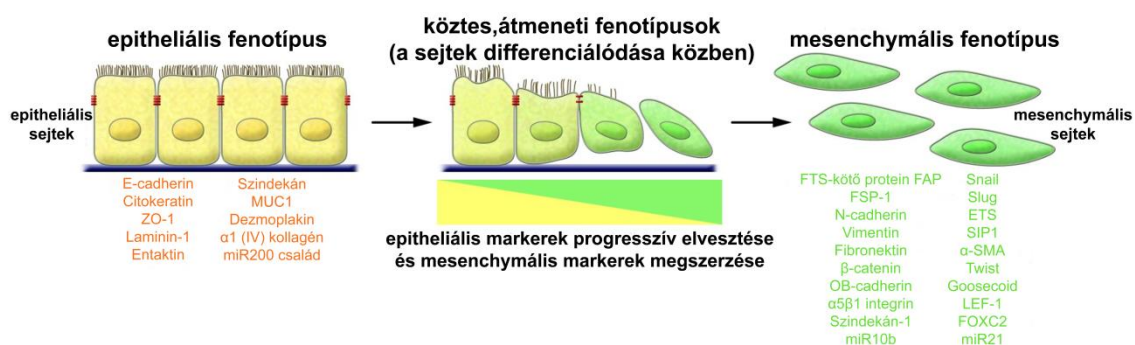
zonula occludens-1) azonban nem (32). A tight junction felbomlásáért az EMT egyik legfontosabb induktora, a TGF- $\beta$  is felelős a polaritás komplexben lévő PAR6 fehérjével való interakcióján keresztül (16).

- ◆ A zonula adherenseket kialakító fehérjék összetétele átalakul, és történik egy úgynevezett cadherin „switch”, amely fontos eleme az EMT-nek. A hámsejtek adherens kapcsolataiban résztvevő epitheliális-cadherin (E-cadherin) lehasítódik a plazmamembránról, degradálódik, mennyisége lecsökken; ezzel ellentétben a neurális-cadherin (N-cadherin) mennyisége viszont megnő, jelezvén, hogy a sejtek a mesenchymális sejtekre jellemző sejtadhéziós fehérjét expresszálják, és nagyobb affinitással kötődnek már ekkor mesenchymális sejtekhez, mint a hámsejtekhez (17, 28). Az E-cadherin szabályozó régiója a gén promóterén belül található úgynevezett E-boksz. Ha az EMT-t stimuláló indukciós jelátviteli útvonalak egyik transzkripciós faktora, például a Snail vagy a Slug hozzáköt ehhez az E-boksz régióhoz, akkor represszálja az E-cadherin szintézisét, és még inkább lecsökken az E-cadherin expressziója (33). Tekintettel arra, hogy a hámsejtek homeosztázisának fenntartásához lényeges faktor az E-cadherin, annak downregulációja ahhoz vezet, hogy csökken a dezmoszómális fehérjék (dezmozoplakin, plakoglobin, dezmozoglein) szintje is (34).
- ❖ **Megszűnik a sejtek bazális membránnal való sejt-mátrix kapcsolata (hemidezmoszóma) (29).**
  - ◆ Az extracelluláris mátrix és a bazális membrán proteolitikus lebontását a sejtek aktinban gazdag, úgynevezett invadopódiumai végzik. Ezek a nyúlványok az extracelluláris mátrix proteolitikus enzimeinek, mátrix metalloproteinázok (MMP-2, MMP-9) szekréciójával segítik elő a sejtek mozgását (28, 34). Az MMP-k családjába csaknem 23 fehérje tartozik, amelyek mindegyike cinkion-függő, endopeptidáz funkcióval rendelkeznek, és közel hasonló szerkezetük van. Proteolitikus aktivitásukat pedig főként szöveti inhibitoraik, a TIMP (TIMP1-4) fehérjék szabályozzák (34).
- ❖ **Átszerveződik a sejtek citoskeletális rendszere (17).**
  - ◆ Az addig jellemző aktin váz, a hozzá kihorgonyzó  $\beta$ -cateninnel, és a már említett E-cadherinnel szétszerelődik, a citokeratin és a hemidezmoszómális integrinek helyett a vimentin, a fibronectin és más, például az  $\alpha 5\beta 1$  integrin



lesznek a meghatározó intermedier filamentumok, illetve sejtadhéziós fehérjék (17, 28).

- ♦ Az EMT-n áteső sejtek teljesen átszervezik kortikális aktin vázukat, amelynek eredményeképp lehetővé válik a dinamikus sejtmelegnyúlás és az irányított mozgás. Az új, aktinban gazdag membránnúlványok elősegítik a sejtmozgást, és szenzoros érzékelőknek is felfoghatók. Ezek a núlványok lemezszerű lamellipódiumok és tüskeszerű filopódiumok a lamellipódiumok élén, amelyek révén képes mozogni a sejt (28). Az EMT során fokozódik a sejtkontraktilitás és különböző aktin stressz-szálak képződése is, amelyet feltehetően az aktin monomerek asszociációját és disszociációját elősegítő aktin-kötő fehérjék szabályoznak (28, 35).
- ❖ **EMT-t indukáló faktorok révén a hámsejtekben mesenchymális sejtekre jellemző gén expressziós program indul el, amely révén kialakul az adott sejt típusra jellemző fenotípus (24).**
- ❖ **Bizonyos esetekben az is elmondható, hogy megnő az intracelluláris sejtorganellek száma (36).**



**2. ábra. Az EMT során kialakuló morfológiai és molekuláris változások összefoglaló illusztrációja.** Sárga színnel a hámsejtek, zöld színnel a mesenchymális fenotípusú sejtek jelöltek. Az ábra összefoglalja azokat a faktorokat, amelyek a hám, a mesenchymális és az átmeneti sejtalakokra jellemzőek. (ZO-1, zona occludens-1; MUC1, mucin 1; SIP1, survival of motor neuron protein interacting protein 1; FOXC2, forkhead box C2). (14).

#### 2.2.4. Az EMT-MET indukciója, molekuláris háttere

Az EMT és a MET folyamatát *in vitro* hám sejtvonalakon, és *in vivo* rendszerekben is tanulmányozhatjuk, mivel számos olyan faktor ismert, amelyekkel ezek az differenciációs mechanizmusok indukálhatók. Az EMT induktorai közé olyan növekedési faktorok tartoznak, mint például a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ), az epidermális (EGF), a fibroblaszt (FGF), az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1), vagy a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), amelyek megfelelő szerin/treonin vagy tirozin kináz receptorukhoz kötve kiváltják az EMT-t (15, 17, 37). A növekedési faktorok közül talán a hepatocita növekedési faktor (HGF) az, amely nem sorolható egyértelműen az EMT-t indukáló stimulusok közé. Ismeretesek olyan adatok, amelyek szerint a HGF EMT-t képes indukálni leginkább tumoros megbetegedések, vagy az egyedfejlődés bizonyos szakaszaiban (szomitogenezis, bél és vese polarizált epitheliumának kialakulása) (14, 15, 38). Vannak viszont források, amelyek a MET-t aktiváló faktorok közé sorolják (39), hiszen képes csökkenteni a TGF- $\beta$  szintjét, helyreállítani a TGF- $\beta$  által downregulálódott E-cadherin expresszióját, és potenciálisan csökkentheti az aktív MMP-9 mennyiségét (40). Mindezek alapján úgy tűnik tehát, hogy a HGF szerepe a biológiai folyamat idejétől és típusától függ.

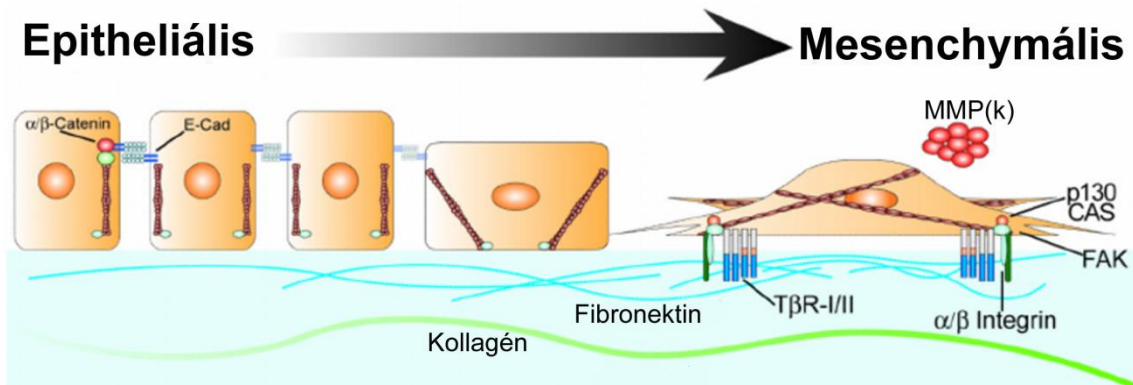
A gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban kiemelt fontossággal bíró makrofágok által termelt citokinek között is vannak EMT-t indukálók, mint például az interleukin (IL) család néhány tagja (IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6), vagy a tumor nekrozis faktor alfa (TNF $\alpha$ ) (9). Az EMT ezeken kívül előidézhető akár hiperozmotikus, hiperglikémiás és savas oldatos kezelésekkel is, például gyulladáshoz kapcsolódó körülmények között (41). Disszertációm a későbbiekben ilyen, indukált gyulladáshoz kapcsolódó körülmények között tanulmányozott mesothel sejtek mesenchymális átalakulását, majd a gyulladás lecsengése utáni regenerációt részletezi majd.

Az előbbiekből elmondhatjuk, hogy EMT indukálására megannyi faktor képes, a növekedési faktorok közül azonban talán a TGF- $\beta$  az a citokin, amelynek kapcsolata az epitheliális-mesenchymális átalakulással az egyik legjobban feltérképezett és körüljárt téma.

A TGF- $\beta$  egy olyan, szerkezetileg rokon, reguláló fehérjék szupercsaládjához tartozik, amelynek ma már több, mint 40 tagját ismerjük (34). Ezen fehérjék ortológjai

már olyan primitív állatok genomjában is megtalálhatóak, mint a *Trichoplax adhaerens* korongállatka (42). A TGF- $\beta$  szupercsalád két nagy alcsaládra bontható a hasonló szekvenciájuk és az általuk aktivált specifikus jelátviteli utak alapján. Az egyik alcsaládba a TGF- $\beta$ , az aktivin és a Nodal tartoznak, a másik alcsaládba pedig a csont morfogenetikus protein (BMP), a növekedési és differenciálódási faktor (GDF), valamint a Müllerian-gátló faktor (MIS) - más néven anti-Müller hormon (AMH) (43) - sorolható (44). Az emlős sejtekben három, genetikailag elkülöníthető, de fehérje szekvenciájukat tekintve jelentős homológiát mutató TGF- $\beta$  izoforma expresszálódik (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3), amelyeket humánban a 19q13, 1q41 és 14q24 kromoszómákon lévő gének kódolnak (34). Mindkét alcsalád tagjaira általánosságban jellemző, hogy többnyire parakrin módon szabályoznak, vagyis a szomszédos sejtekre hatnak (42).

A TGF- $\beta$  jellegét tekintve egy nagyon sokszínű, multifunkcionális faktor (42, 45). Számos biológiai folyamat kulcsfontosságú eleme a férgekől kezdve a rovarokon át egészen az emlős fajokig, hiszen a sejtes folyamatok sokaságát képes szabályozni. Szerepet játszik a sejtors meghatározásában az embriogenezis során és érett szövetekben is, hatással van a sejtproliferációra, a differenciációs folyamatokra, de még az apoptózisra is (44). Továbbá fenntartja a már differenciált sejtek homeosztázisát, és elősegíti a tumorok kialakulását (34). Az EMT során betöltött szerepe szintén igen sokrétű, ugyanis számos ponton indukálja a mesenchymális átalakulás alatt lejátszódó morfológiai és molekuláris változásokat (45) (**3. ábra**). A TGF- $\beta$  stimulálja a sejtkapcsolatok delokalizációját és esetleges degradációját, így csökkenti a hám integritását is. Növeli a sejtek invazív jellegét, mivel elősegíti az MMP-2 és -9 expresszióját. Megfigyelhető továbbá, hogy a TGF- $\beta$  aktiválja a fokális adhéziók kialakulását, valamint hatására a vimentin, a simaizomra jellemző aktin ( $\alpha$ -SMA) és a különböző integrinek expressziója is indukálódik (45).



**3. ábra. TGF- $\beta$  hatására kialakult celluláris válaszok az EMT során.** A TGF- $\beta$  szerepet játszik a sejt kapcsolat felbomlásában, az ECM szervezésében, az aktin váz átformálásában és a fokális adhézciók kialakításában is. (45).

A TGF- $\beta$  citokin intracelluláris jelátvittele nagyon összetett folyamat. Maga a TGF- $\beta$  ligandum aktív formában egy hidrofób kölcsönhatásokkal stabilizált, diszulfid-híd kapcsolt dimer, és a dimerizációja nélkülözhetetlen a receptor aktivációjához (34, 42, 44). Receptorai az egyszeres transzmembrán doménnel rendelkező, szerin/treonin kináz aktivitású TGF- $\beta$  receptor I és II (TGF- $\beta$ R I és II), amelyek közül a TGF- $\beta$ R I (T $\beta$ R-I) a jelindításért, a TGF- $\beta$ R II (T $\beta$ R-II) pedig a TGF- $\beta$ R I aktiválásáért felelős (42). Létezik egy harmadik, járulékos receptor is, a TGF- $\beta$ R III (T $\beta$ R-III, vagy bétaglikán), amely specifikusan, csak bizonyos sejt típusok felszínén jelenik meg, viszont ha expresszálódik, akkor feladata az érkező TGF- $\beta$  ligand megkötése és bemutatása a másik két, szignaling receptor számára (45). Abban az esetben, amikor TGF- $\beta$ R III nincs jelen a sejtek felszínén, a TGF- $\beta$  ligandum először a TGF- $\beta$ R II-höz kötődik. Ez a lépés kell a jeltovábbító TGF- $\beta$ R I toborzásához. Ezt követően a TGF- $\beta$ R II foszforilálja a komplexhez csatlakozott TGF- $\beta$ R I-et, így aktiválja azt. Ennek az aktivált ligand/heteromer receptor komplexnek az összeszerelődése kell ahhoz, hogy a citoplazmatikus jel elinduljon. Innen két irányba mehet tovább a jelátvitel (**4. ábra**): vagy az úgynevezett Smad-függő, kanonikus útvonal felé, vagy az úgynevezett Smad-független, nem kanonikus utak irányába (34, 42, 45).

Azt, hogy a két lehetséges útvonal közül, melyik indul el, a receptor komplex aktivációs mechanizmusa fogja megszabni. A TGF- $\beta$ R I és II ugyanis szerin/treonin (Ser/Thr) vagy tirozin (Tyr) aminosavakon is foszforilálhatóak, így a receptorokon kialakult

foszforilációs mintázat a kulcs, amely determinálja, hogy a Smad-függő vagy a Smad-független irányba induljon el a jelátvitel. A ligandumot megkötő TGF- $\beta$ R II konstitutívan aktív és autofoszforilálhatja önmagát. A Ser213 és a Ser409 aminosavak foszforilációja elengedhetetlen a TGF- $\beta$ R II kináz aktivitásához, míg a Ser416 foszforilációjának gátló hatása van (46). A TGF- $\beta$ R II kináz aktiválódása esetén képes többféle szerin és treonin aminosavakon foszforilálni a TGF- $\beta$ R I intracelluláris TTSGSGSG szekvenciáját, GS doménjét (44). A TTSGSGSG motívum kettő vagy annál több aminosavát érintő mutációja a TGF- $\beta$ R I kináz aktivitásának csökkenéséhez vezet (46). A GS domén egy olyan rövid juxtamembrán szakasz a receptoron, amely a transzmembrán és a katalitikus kináz domén között helyezkedik el, és minden I-es típusú receptoron megtalálható. Ennek a GS doménnek a savas felszíne képes egy receptor asszociált Smad fehérje bázikus felszínéhez kötődni, amelynek eredménye az lesz, hogy a TGF- $\beta$ R I kináz foszforilálni tudja a hozzá asszociált Smad fehérjét, és így a jel a kanonikus út irányába megy tovább a célgén felé (47). A TGF- $\beta$  receptorok foszforilációja azonban tirozin aminosavakon is megtörténhet. Szakirodalmi adatok alapján a TGF- $\beta$ R-II autofoszforilálódhat három tirozinján is (Tyr259, Tyr336 és Tyr424), amelyek mutációja erősen gátolja a receptor kináz aktivitását (46). Továbbá az is ismeretes, hogy az Src kináz foszforilálni tudja a TGF- $\beta$ R II-t 284-es tirozin aminosaván, így az SH2-domént tartalmazó növekedési faktor receptor-kötő protein 2 (Grb2) és Shc adaptereken keresztül a p38 mitogén-aktivált protein (MAP) kináz útvonal felé továbbítja a jelet (46). A TGF- $\beta$ R I tirozinon való foszforilációja révén szintén egy Smad-független út, az extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK) jelátvitel fog végbemenni a TGF- $\beta$  hatására (47).

#### ❖ A Smad-függő, kanonikus útvonal:

A jelátvitel ezen útvonal során a TGF- $\beta$  receptoroktól a Smad fehérjéken keresztül zajlik. Emberben a Smad fehérjék családjába nyolc protein tartozik, amelyek közül öt (Smad1, 2, 3, 5 és 8), az úgynevezett receptor által regulált és ahhoz kötődő R-Smad-ok. Ezen faktorok C-terminálisa tartalmazza azt a Ser-X-Ser motívumot, amelyet a TGF- $\beta$ R I képes foszforilálni (48). A TGF- $\beta$ , az aktivin, és a Nodal receptorai az adott szignált a Smad2 és Smad3 útján közvetítik (42). A másik alcsalád tagjai, mint a BMP vagy az anti-Müller hormon pedig a Smad1, 5 és 8 fehérjéken keresztül bonyolítják a jelátvitelt. Az említett nyolc fehérje közé tartozik a Smad4, amely az úgynevezett Co-

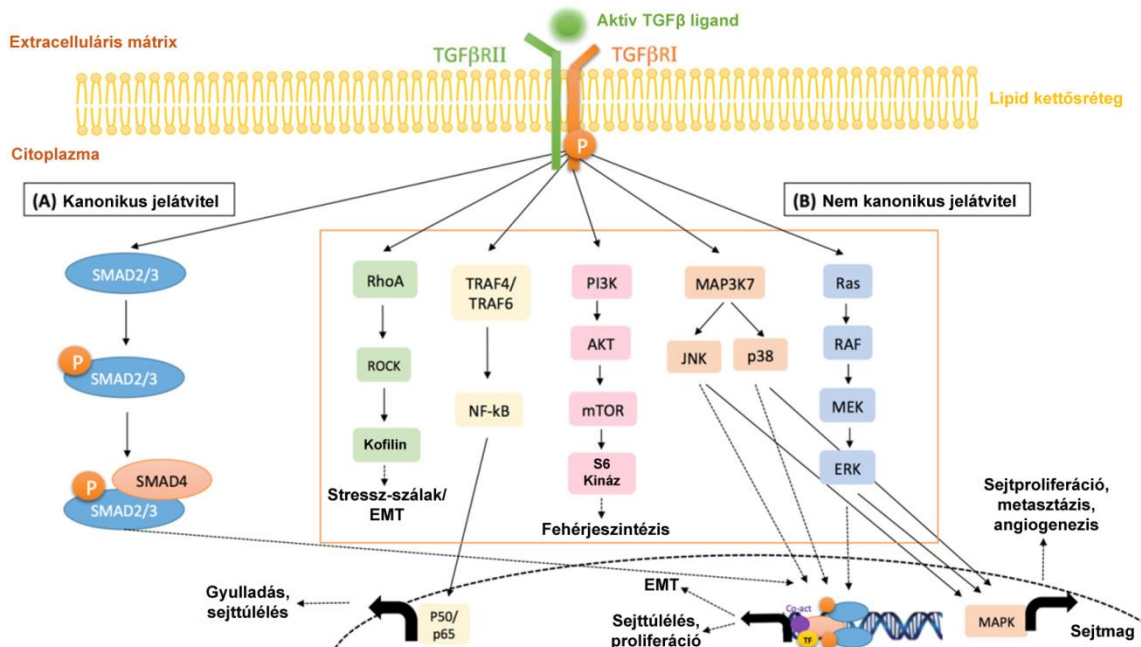
Smad-ok csoportjának egyetlen képviselője. A receptor-foszforilált R-Smad-ok párba állnak, majd egy Smad4 molekulához kötve homotrimert vagy heterotrimert formálnak. A Smad4 mivel partnere az összes R-Smad-nak, és a legtöbb TGF- $\beta$  szupercsaládhoz tartozó faktor hatására kialakult génválaszhoz szükséges, ezért nevezték el Co-Smad-nak, közös, mediátor Smad-nak. A Smad fehérje család utolsó két tagja a gátló Smad6 és Smad7 fehérjék, az inhibitor Smad-ok (I-Smad) csoportját alkotják, és feladatuk, hogy kapcsolatba lépve az aktivált receptorokkal és R-Smad fehérjékkel gátolják azok működését (48).

Konkréten a TGF- $\beta$  jelátvitelében szereplő, már említett Smad2-t és Smad3-at az aktív TGF- $\beta$ R I foszforilálja. A foszforilált R-Smadok ezután a Smad4-hez kapcsolódva heterotrimer komplexként együtt bekerülnek a sejtmagba, majd különböző transzkripciós aktivátorokon és represszorokon keresztül a TGF- $\beta$  válasz génnek specifikus expresszióját irányítják. Ezek a génexpressziós változások okozzák az EMT alatt tapasztalható morfológiai és genetikai módosulásokat a hámsejtekben (45). A Smad2/3 szignál időtartamát és erősségét számos faktor képes befolyásolni. A jelátvitelt segítő adapter vagy kihorgonyzó fehérjék, mint például a SARA vagy a Dab2 biztosítják a Smad2 és 3 foszforilációját. Ezzel szemben a már említett I-Smad-ok viszont megakadályozzák az R-Smad fehérjék foszforilációját, és degradációra küldik a TGF- $\beta$  receptorokat (45).

#### ❖ **A Smad-független, nem kanonikus útvonalak:**

A TGF- $\beta$  jel sok egyéb, a Smad fehérjéket nem érintő alternatív jelátviteli útvonalat is képes indukálni a sejtben belül. Ezen szignál útvonalak sokfélesége biztosítja a TGF- $\beta$  multifunkciós szerepét a sejtek életében (34). TGF- $\beta$  stimulusra aktiválódhatnak a: foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) - protein kináz B (PKB/Akt) - mechanikai/érintés rapamycin célfehérje (mTOR) jelátvitel; az ERK1/2, c-Jun N-terminális kináz (JNK), p38 MAP kináz útvonalak; a nukleáris faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), valamint a kis, GTP-kötő fehérjék, például a Rac1, Ras, RhoA GTP-ázok által közvetített szignaling mechanizmusok is (34, 45). Habár számos jelátviteli útvonal indukálódhat TGF- $\beta$  jelenlétében, hatását végső soron mindig a transzkripciós faktorok és a gének szintjén éri el. A Snail, a ZEB1, a Twist vagy a Stat3 transzkripciós faktorok aktiválásával indukálja az EMT-specifikus gének átíródását, valamint DNS-metilációs

módosításokkal képes represszálni bizonyos gének, például az egyik legfontosabb epitheliális faktor, az E-cadherin expresszióját (45).



**4. ábra. A TGF- $\beta$  által indukált jelátviteli utak sematikus összefoglaló ábrája.** Az illusztráció feltünteti a kanonikus és nem kanonikus jelátviteli utak lehetséges kimeneteleit, és azt, hogy az általuk szabályozott génexpressziós mechanizmusok milyen sejtleletani folyamatokat indítanak el. (TRAF4/6, TNF receptor-asszociált faktor 4/6). (49).

Eddigi ismereteink alapján levonható tehát az a következtetés, hogy az EMT egy nagyon összetett, és finoman szabályozott folyamat, amelynek lépései, jelátviteli útvonalai meglehetősen jól ismertek. Nem vitatható azonban, hogy a MET, az EMT ellentettje legalább olyan komplex, létfontosságú folyamat. Szerepe például az embriogenezis folyamán megkérdőjelezhetetlen (14, 27), viszont az általános szabályozásában szerepet játszó szignalizációs útvonalokról kevesebbet tudunk. Folyamatának feltérképezése főleg metasztázisok kapcsán került előtérbe, mivel kulcs szerepe van az áttétes megbetegedések kialakulásában (23, 29). Számos patológiai, molekuláris és morfometriai vizsgálat segítségével azonban sikerült néhány olyan tényezőt azonosítani, amelyek biztosan befolyásolják a MET mechanizmusát. Annak fényében, hogy az EMT és a MET általában egymással összefüggésben álló, sokszor

egymást kiegészítő folyamatok (18), érhető, hogy jelátviteli útvonalai között is vonható némi párhuzam. Az egyik ilyen párhuzam a TGF- $\beta$  szupercsaládhoz vezet.

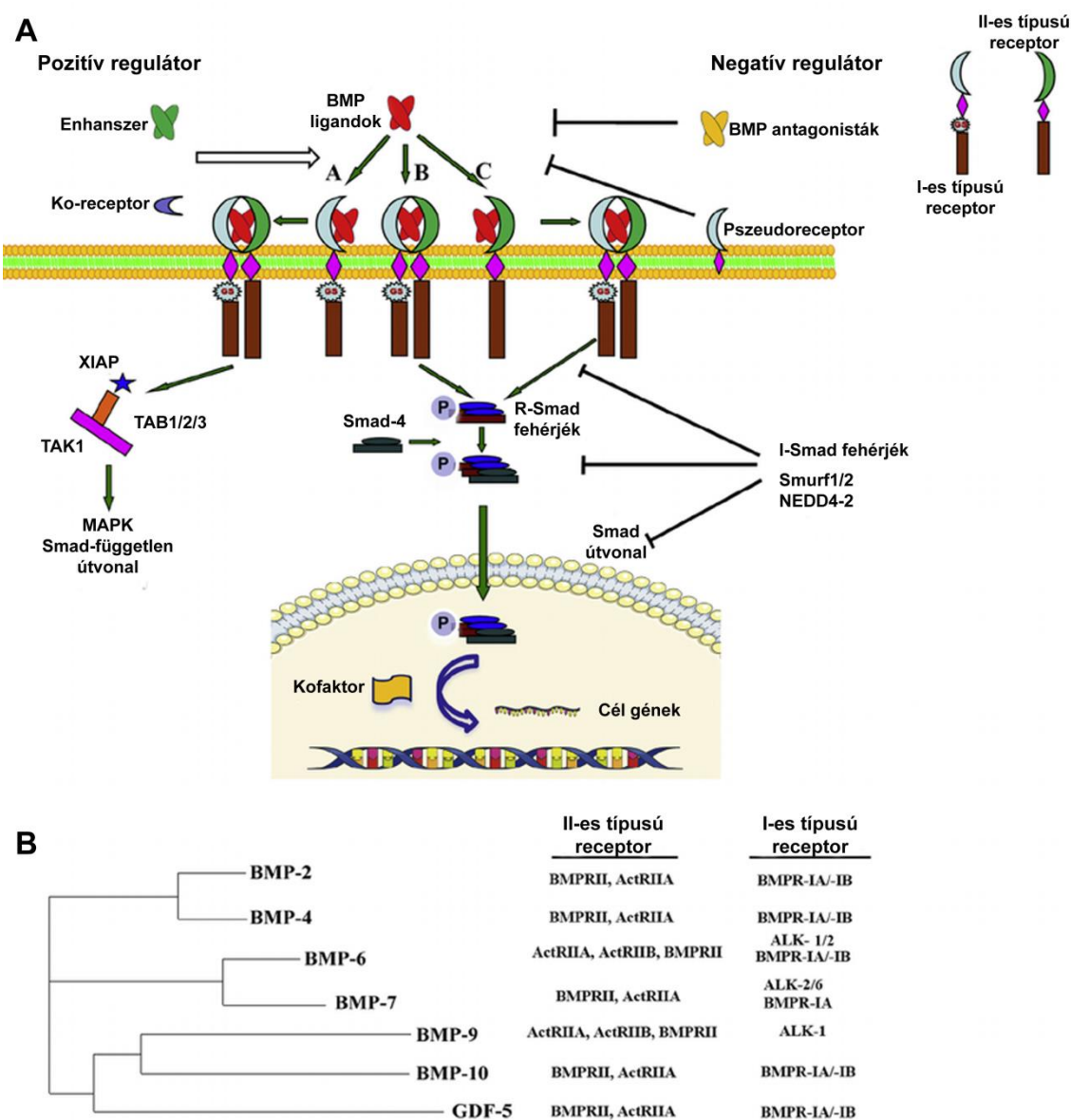
A BMP-k multifunkcionális növekedési faktorok, amelyek - a BMP1 metalloproteáz kivételével - a TGF- $\beta$  szupercsaládhoz tartoznak, és csakúgy, mint a család összes tagja, számos biológiai folyamatban igen jelentős szereppel bírnak (50, 51). Eddig több mint 20-féle BMP fehérjét azonosítottak és karakterizáltak a kutatók (51). Szerepüket az elmúlt években alaposan tanulmányozták az embrionális fejlődés során, valamint különböző celluláris folyamatokban posztnatális és felnőtt állatokban egyaránt (51). Már az 1960-as években rábukkantak a BMP-k működésére, maguk a fehérjék azonban ismeretlenek maradtak a '80-as évek végéig (52), amikor először tisztítottak és szekvenáltak szarvasmarha osteogenint (BMP3), és klónoztak humán BMP2-t, illetve BMP4-et, így azonosították őket, mint csont- és porcképződést indukáló molekulákat (50, 51). A hosszú évtizedek óta végzett különböző vizsgálatok kimutatták, hogy a BMP jelátvitel központi szerepet játszik még a szívfejlődésben és az idegrendszer kialakulásában is (51). Emellett gerincesekben fontos regulátora a végtag- és fogfejlődésnek, vezérli a dorzo-ventrális irány kialakulását, és szabályozza az apoptózist (50). Az, hogy a BMP fehérjék is - csak úgy, mint a TGF- $\beta$  - rendkívül sokszínű funkciót képesek ellátni annak köszönhető, hogy szignaling mechanizmusaikban számos intracelluláris partner vesz részt, és a kialakuló jelátviteli utak kommunikálva más útvonalakkal nagyon sokféle választ tudnak létrehozni (50).

A BMP fehérjék ahhoz, hogy biológiailag aktív ligandumként jelátvitelt tudjanak indukálni proteolitikus hasításon mennek keresztül, majd homo- és heterodimereket formálnak. Bizonyos heterodimerek, mint például a BMP2/6, a BMP2/7 vagy BMP4/7 jóval hatékonyabbak, mint homodimerjeik (53). Az aktív ligandumok ezután - ugyanúgy, ahogyan a korábban említett TGF- $\beta$  is - egyszeres transzmembrán doménnel rendelkező szerin/treonin kináz receptorokon (BMPR-I és -II) keresztül képesek jelátviteli folyamatokat indukálni (50). A receptoroknak számos altípusa létezik, hatféle I-es típusú és háromféle II-es típusú receptorról tudjuk, hogy képes BMP jelet közvetíteni (53). BMP ligandumot a háromféle II-es típusú receptorból specifikusan csak a BMPR2 (BMPR-II) tud kötni, a 2A és 2B típusú receptorok (ACVR2A és 2B, vagy ActR-II és ActR-IIB) aktivin kötéséért is felelnek (51, 53). Az I-es típusú receptorok közül a BMPR1A (BMPR-IA, más néven ALK-3) és BMPR1B



(BMPR-IB, ALK-6) képes csak BMP ligand kötése által jelátvitelt indítani, a többi az aktivin vagy a TGF- $\beta$  szignál transzdukciós folyamatában játszik szerepet (53). Mindkét receptor típus tartalmaz egy ligandkötő domént az extracelluláris N-terminálisán, ezért mindkét receptornak van szerepe a beérkező ligandum megkötésében (53). A két típusú receptor a ligandum kötése után aktív heterotetramer receptor-komplexet formál, ezt követően pedig jelátviteli folyamatokat indít el. Hasonlóképpen zajlik a folyamat, ahogyan az már a TGF- $\beta$  szignaling esetében bemutatásra került. A BMPR2 transzfoszforilálja az I-es típusú receptor GS doménjét, amely egy downstream jelátviteli kaszkádot indít el (53).

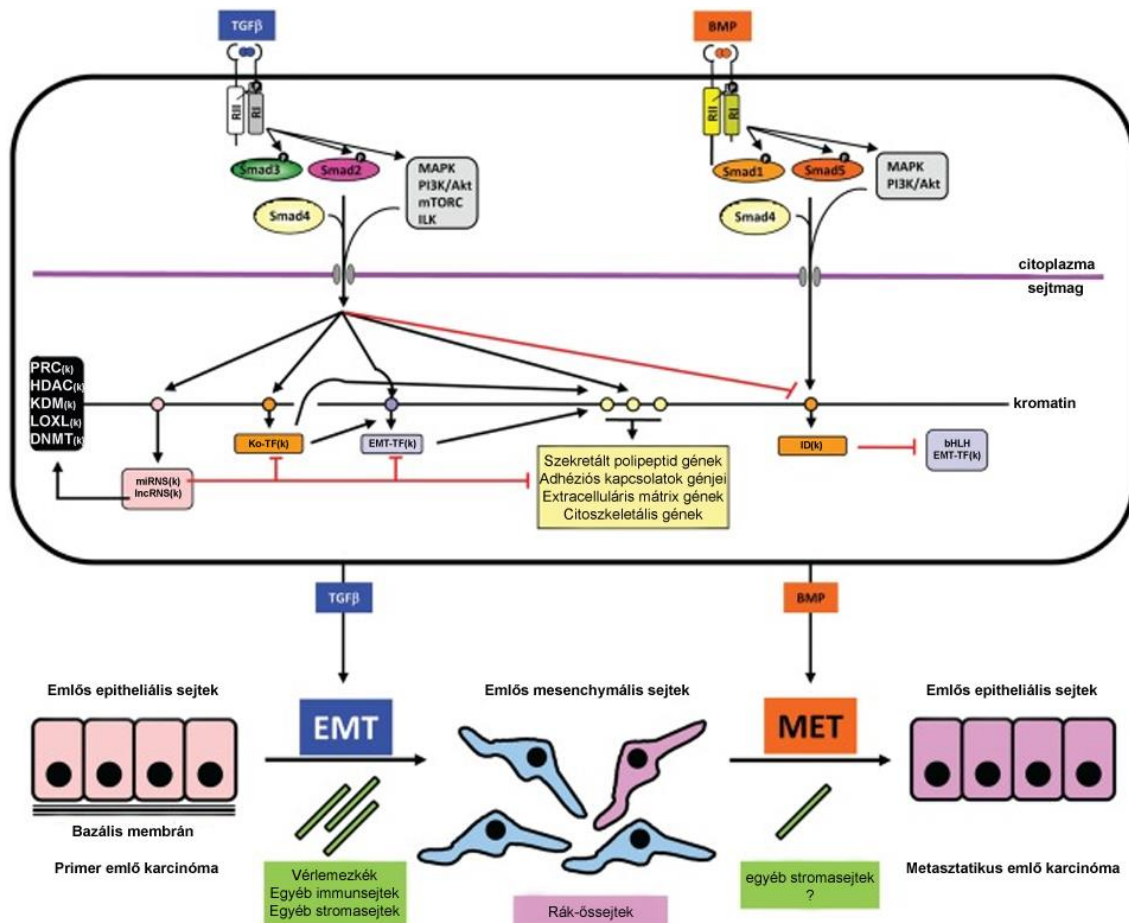
A jelátvitel ebben az esetben is kétféle irányba indulhat el: Smad-függő és Smad-független útvonalak felé (**5. ábra**). Az egyes típusú BMP receptor szubsztrátjai közé tartoznak a már említett Smad fehérjék, amelyek közül a Smad1, az 5 és a 8 a BMP receptorok közvetlen downstream molekulái. Ezeket a Smad fehérjéket ligandum-függő módon foszforilálják a BMP receptorok, majd a foszforilált formájuk társul a Smad4 fehérjével, amely közös partnere minden receptor-asszociált Smad-nak. Ez az aktivált, heteromer komplex aztán transzlokálódik a sejtmagba, és génexpressziós folyamatokat indukál más transzkripciós faktorok közreműködésével (51). Azonban a BMP-k esetében is aktiválódhat Smad-független útvonal. Vannak adatok, amelyek szerint a BMP fehérjék nagyobb affinitással kötődhetnek az I-es típusú receptorokhoz. A ligandum a BMPR1A-hoz vagy 1B-hez kötve segíti a BMPR2 toborzását a heterooligomer komplexhez, amely végül Smad-független jelátvitel beindítását eredményezi majd (53). Az apoptózis gátlásában szerepet játszó, úgynevezett XIAP adapter fehérjeként működik az I-es típusú receptor és a TAB fehérjék (TGF- $\beta$  aktivált kötőfehérje 1, 2, 3) között, amely később bekapcsolja a TGF- $\beta$  aktivált tirozin kináz 1-et (TAK1). Ez a TAK1 nevezetű fehérje pedig olyan útvonalakat indít be, mint például a MAP kináz, a JNK vagy az NF- $\kappa$ B jelátviteli mechanizmusok (53).



**5. ábra. A BMP által indukált jelátviteli utak összefoglaló ábrája. (A):** Az ábra feltünteti a BMP jel hatására kialakuló Smad-független útvonalak közül a MAP kináz jelátviteli útvonalat, továbbá a Smad-függő jelátvitelt is. Az I-Smad fehérjéken kívül az úgynevezett Smurf1/2, valamint a NEDD4-2 faktorok az R-Smad fehérjék degradációja révén gátolni tudják a jelátvitelt. **(B):** A BMP ligandumok és az azokra specifikus I-es és II-es típusú receptorok filogenetikai csoportosítása. (Smurf, Smad ubiquitinilációt reguláló faktor). (53).

A BMP számos sejtélettani folyamat fontos szereplője, de leginkább fejlődéstani vonatkozásai ismertek. Kiemelendő azonban, hogy más celluláris folyamatoknak is kulcsfontosságú szabályozója. Vannak arra vonatkozó adatok, hogy a BMP fehérjék,

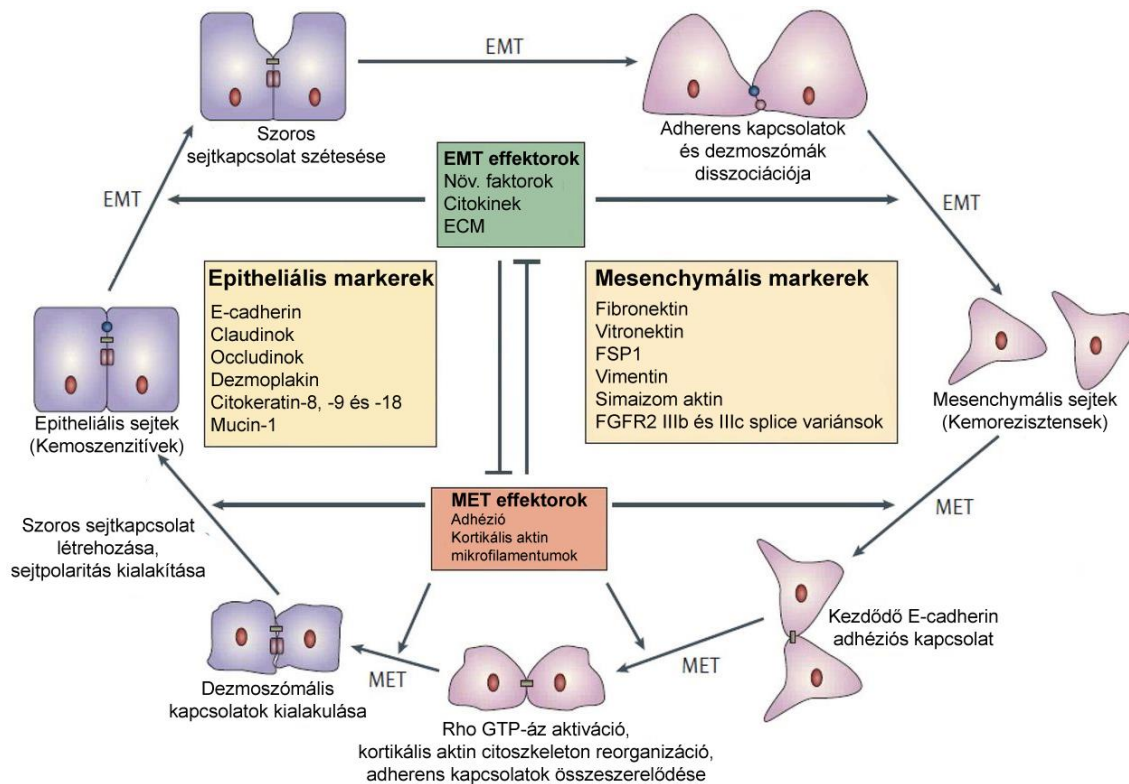
ellensúlyozva a TGF- $\beta$  hatását MET-et indukálnak számos tumoros sejten (23) (6. ábra). Prostatára, emlőrák és nyelőcsői adenokarcinóma vizsgálata során kimutatták, hogy BMP7-tel előidézhető a mesenchymális jellegű sejtek epitheliális visszaalakulása (23). Humán melanoma sejteken végzett vizsgálatok során is azt találták, hogy BMP7 kezelés hatására csökkent a tumorsejtek migrációs képessége, így kevésbé voltak invazívak; továbbá, az EMT-t indukáló fontos transzkripciós faktorok (Snail, Twist, Slug stb.) szintézisének csökkentésével kiváltható volt a MET (54). Az említett transzkripciós faktorok gátlásával olyan gének expressziója indulhatott el újból, mint például az E-cadherin, amely nemcsak jellegzetes hámsejt marker, hanem jelentős MET-et stimuláló hatása is van. Jelentőségére már 1988-ban felfigyeltek egér szarkóma S180-as sejtvonal vizsgálata során (55).



**6. ábra. A TGF- $\beta$  és a BMP szerepe az EMT és MET indukációjában.** TGF- $\beta$  stimulus hatására az EMT-specifikus transzkripciós faktorok aktiválódnak, és végbemehetnek az EMT-re jellemző morfológiai, molekuláris változások. A BMP szignál indukálta szabályozás fordítva történik: az úgynevezett differenciációs inhibitor

gének (ID gének) aktiválódnak, amelyek negatívan regulálják az EMT specifikus transzkripciós faktorait. Az ábra mutatja a microRNS-ek, a hosszú, nem kódoló RNS-ek (lncRNA) és a kromatinszabályozó faktorok represszáló hatását is. (56).

Az említett példák és adatok egyértelműen azt mutatják, hogy az EMT és a MET rendkívül szoros kapcsolatban állnak. Az indukáló hatások közötti finom hangolások kulcsfontosságúak mind az EMT, mind a MET lefolyásában. A hám-, illetve a mesenchymális jellegű sejtekben zajló jelátviteli utak egy komplex hálózatot alkotnak, és tagjai között állandó a kommunikáció. A különböző szignalizációs szabályozások egymásra gyakorolt hatása, kiegyenlítése vagy ellensúlyozása pedig szigorúan befolyásolja az EMT és MET során lejátszódó ellentétes irányú morfológiai, molekuláris és biokémiai változásokat, amelyek a sejtek fenotípusának kialakításáért felelősek (7. ábra).



7. ábra. Az EMT és a MET indukáló hatásai, és a két folyamat kulcsfontosságú lépései. (57).

## 2.3. A kolónia-stimuláló faktorok

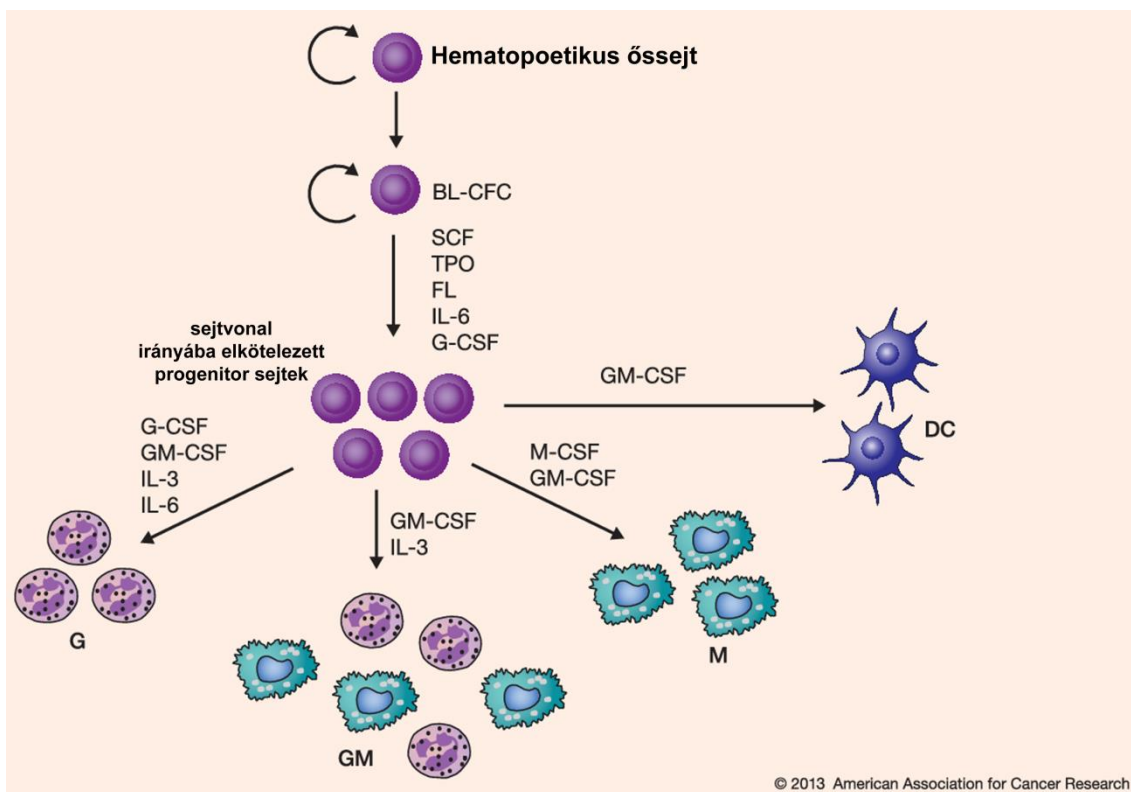
### 2.3.1. A kolónia-stimuláló faktorok felfedezése

Már az 1960-as évektől fogva voltak próbálkozások arra, hogy megismerjék a különböző fehérvérsejt populációk homeosztázisának regulátorait. A nagy áttörést végül két kutatócsoport érte el szinte egy időben, amikor is olyan módszert fejlesztettek ki, amellyel sikerült fehérvérsejt kolóniákat növeszteni egér csontvelőből és lépből származó sejtekből félig szilárd agaron, majd metilcellulóz kultúrákban (58–60). A különleges az volt ezekben a tenyészetekben, hogy egy progenitor sejt klónjai voltak, és hogy a telepek kialakulása, nagysága és száma függött a hozzájuk adott szövet extraktumoktól, illetve a különböző szövetek által kondicionált médiumtól. Egyértelmű volt, hogy a tenyészetek fenntartásához és a kolóniák formálásához elengedhetetlen egy addig ismeretlen faktor (később kolónia-stimuláló faktor), amely segíti a rendszer fennmaradását, a sejtek osztódását (58). Már az 1970-es évek elejétől van irodalmi adat a kolónia-stimuláló faktorról (CSF) végzett kísérletekről. Trudgett és munkatársai 1973-ban *in vivo*, életképes *Salmonella typhimurium*-al fertőzött egerekben, illetve *in vitro* körülmények között vizsgálták a granulocita-makrofág kolóniát formáló progenitor sejteket, valamint a CSF szerepét ezekre a sejtekre és a makrofágok aktiválására (61). Ekkor már arra vonatkozóan is voltak adatok, hogy olyan regulátor molekulák, mint a makrofág-növekedési faktor (MGF) és a CSF szabályozni képesek a már aktivált peritoneális makrofágok proliferációját, stimulálják különböző helyekről származó progenitor sejtek differenciációját és granulocita és/vagy makrofág kolóniák formálását (62).

### 2.3.2. A kolónia-stimuláló faktorok csoportosítása, funkciója, jellemzői

Kezdetben úgy gondolták, hogy csak egy típusú CSF létezik, amely szabályozza a granulociták és a makrofágok termelődését, aktiválódását, később azonban egyértelművé vált, többféle stimulátor fordul elő. Ezen molekulák kinyerése és tisztítása igen nagy erőfeszítéseket vett igénybe, hiszen, - mint utóbb fény derült rá - négy teljesen különbözően glikolizált kolónia-stimuláló fehérjéről volt szó, amelyek mindegyike különböző sejt kolóniákra van stimuláló hatással (58). A főként 1977 és 1986 között végzett kísérletek és analízisek során végül azonosították azt a négyféle faktort (**8. ábra**), amelyeket aztán a különböző stimuláló funkciójuk alapján neveztek el,

és valójában a citokinek csoportjába sorolhatók (63). Az egyik típus a multipotenciális kolónia-stimuláló faktor (CSF), amelyet gyakran interleukin-3-ként (IL-3) említenek, és a vérképző sejt kolóniák széles skáláját képes stimulálni. A másik kettő a granulocita kolónia-stimuláló faktor (G-CSF, vagy más néven CSF3), illetve a makrofág kolóniaképződést stimuláló faktor (M-CSF, másik néven CSF1). A negyedik típus pedig az, a munkánk során is vizsgált glikoprotein, amely a granulocita- (és) makrofág kolóniák képződését egyaránt képes stimulálni, a granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF, avagy CSF2) (58, 63).



**8. ábra.** A négyféle kolónia-stimuláló faktor szerepe az immunsejtek csoportjához tartozó granulociták, makrofágok és dendritikus sejtek differenciálódásában. (DC, dendritikus sejtvonal; TPO, thrombopoietin, FL = Flt3 ligandum). (63).

Ezek a mester regulátorok 18 és 70 kDa közötti molekula tömegű glikoproteinek, szénhidrát-csoportjuk csak fél-életidejüket hosszabbítja meg *in vivo*, biológiai aktivitásuk szempontjából nem szükséges a glikoziláció sem *in vivo*, sem *in vitro* (63).

A CSF-ek speciális membrán-receptorokon keresztül hatnak, amelyek meghatározott válaszokat képesek kiváltani a sejtekben. Annak ellenére, hogy a célsejteknek viszonylag kevés, csak néhány száz receptor van a felszínükön, ezek a stimuláló faktorok rendkívül nagy specifikus aktivitást mutatnak már pikomoláris koncentrációban is (63). A különböző kolónia-stimuláló faktorok a lehetséges biológiai válaszok széles palettáján képesek hatni és ezzel szabályozni a granulociták és makrofágok sejtpopulációit. Legfontosabb funkcióik közé tartozik, hogy gátolni tudják az apoptózis folyamatát; dózis-függő módon stimulálják az egyes sejtosztódásokat; befolyásolni tudják a sejtek elköteleződését és differenciálódási útvonalát; a már valamilyen differenciálódási úton elkötelezett sejt érési folyamatát képesek indukálni és szabályozni; és jelentősen serkentik az érett neutrofil granulociták és makrofágok funkcionális aktivitását (63).

A különböző kolónia-stimuláló faktorok jelentősége nemcsak a kísérletekben, hanem a klinikumban is igen nagy hangsúlyt kap. Ma már a tumoros megbetegedések gyógyítása során is rendkívül fontos szereppel bírnak, ugyanis - például a kemoterápiát követően - több millió rákos betegben sikerült növelni a veszélyesen alacsony fehérvérsejt szintet rekombináns GM-CSF és G-CSF kezeléssel (58).

## **2.4. A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF)**

### *2.4.1. A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) felfedezése*

A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) egy igen fontos hematopoetikus növekedési faktor és immunmodulátor, amelyet először - korábban lipopoliszachariddal (LPS) injektált - egér tüdőszövet-kondicionált médiumban azonosítottak. Ez a tápközeg ugyanis stimulálta az egér csontvelő sejtek proliferációját *in vitro*, és granulocita, illetve makrofág kolóniákat eredményezett (64). A humán GM-CSF-et először 1985-ben szekvenálták meg sikeresen, a rágcsáló megfelelőjét pedig 1994-ben (65).

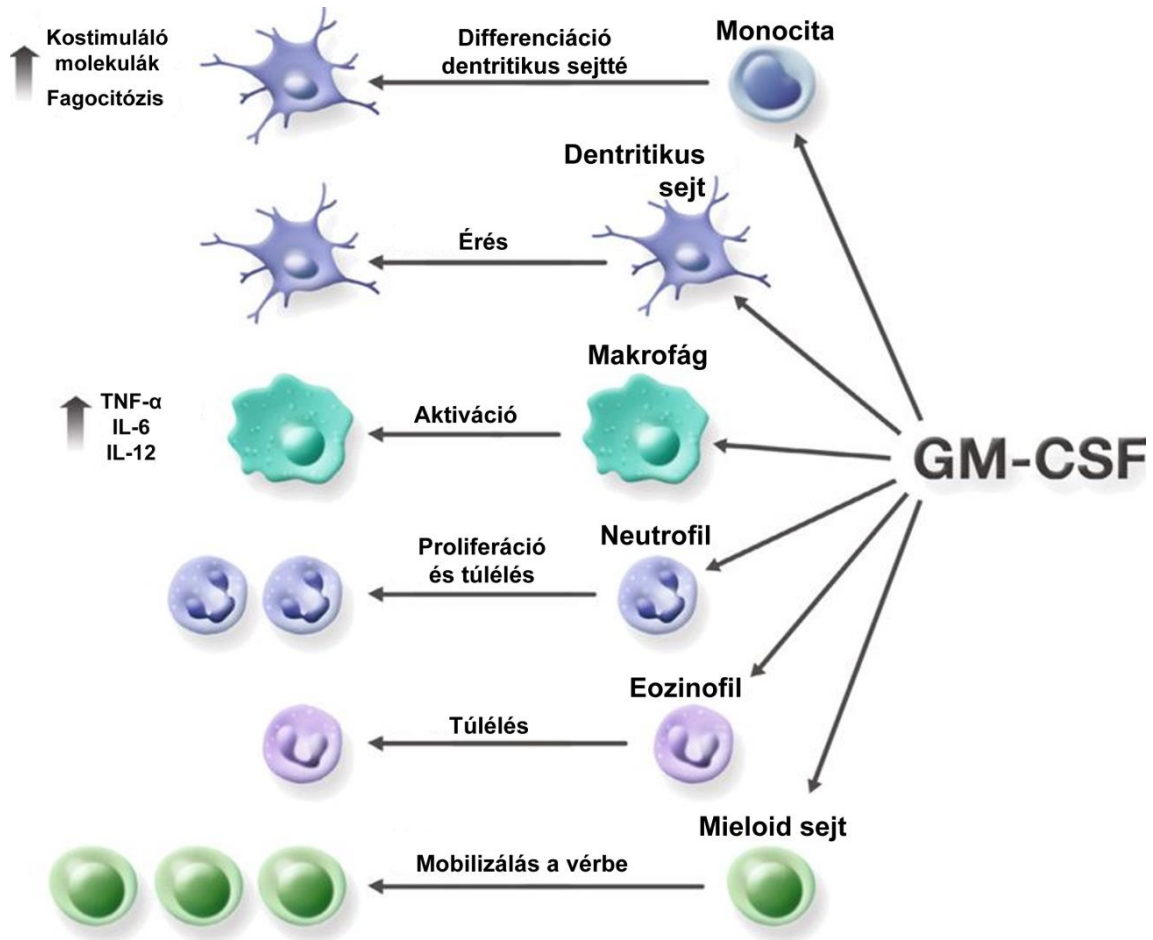
### *2.4.2. A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor (GM-CSF) bemutatása*

A GM-CSF az I-es típusú citokinek közé tartozik, és szerkezetében 4  $\alpha$ -hélix-et figyelhetünk meg. Natív formájában egy monomer, 23 kDa tömegű, glikolizált fehérje,

amely 127 aminosavból áll (64, 65). A GM-CSF gén humánban az 5. kromoszóma hosszú karjának 31-es régiójában található meg (5q31). Jól ismert, hogy az 5. kromoszóma hosszú karjának deléciója akut myeloid leukémiával (AML) társul, azonban az AML nem mindig az 5q deléciójából származik. Ugyanez a kromoszómális régió szorosan kapcsolódik más citokinek (IL-4, -5 és -13) kódoló génekhez is (65).

A GM-CSF szérumbeli koncentrációja fiziológias körülmények között 20-100 pg/ml, amely azonban jelentősen megnő mikrobiális ágensek, különböző citokinek, antigének vagy gyulladásos faktorok (TNF $\alpha$ , IL-1, LPS) stimulálásával (65). GM-CSF-et számos sejtféleség képes termelni mind normál, mind indukált környezetben: T-sejtek, B-limfociták, NK sejtek, neutrofil és eozinofil granulociták, makrofágok, keratinociták, endothel sejtek, sima izomsejtek, fibroblasztok, kondrociták, oszteoblasztok, hízósejtek, multipotens mesenchymális stromalis sejtek és még Paneth sejtek is (64, 65). Arra vonatkozóan is vannak adatok, hogy EGF, lipopoliszacharid vagy TNF indukálásával a mesothel sejtek is képesek GM-CSF-et termelni (66), ahogyan ezt a mi is tapasztaltuk rendszerünkben (67). Bár a GM-CSF szintézisére sokféle sejttípus képes, termelődése és hatása nagyrészt lokálisan, az adott gyulladás környezetében fordul elő (65). A G-CSF-el ellentétben, amely igen specifikusan segíti elő a neutrofil granulociták proliferációját és érését, a GM-CSF hatása jóval több sejtvonalra kiterjed (**9. ábra**), elsősorban a makrofágokra és az eozinofil granulocitákra (68). Ez a citokin igen fontos szerepet játszik egyebek mellett a granulociták és makrofágok differenciációjában, túlélésében, aktiválásában; a dendritikus sejtek érésében és az NK-sejtek differenciációjában (65). Azonban számos nem-hematopoietikus funkciója is van, például hozzájárul a gyulladásos válaszok kialakításához, szabályozza és aktiválja az immunrendszert, aminek következtében számos betegség háttere lehet (pl. Felty-szindróma, szív- és érrendszeri, valamint anyagcsere betegségek), és összeköttetésben áll a tumorsejtekkel is (65).

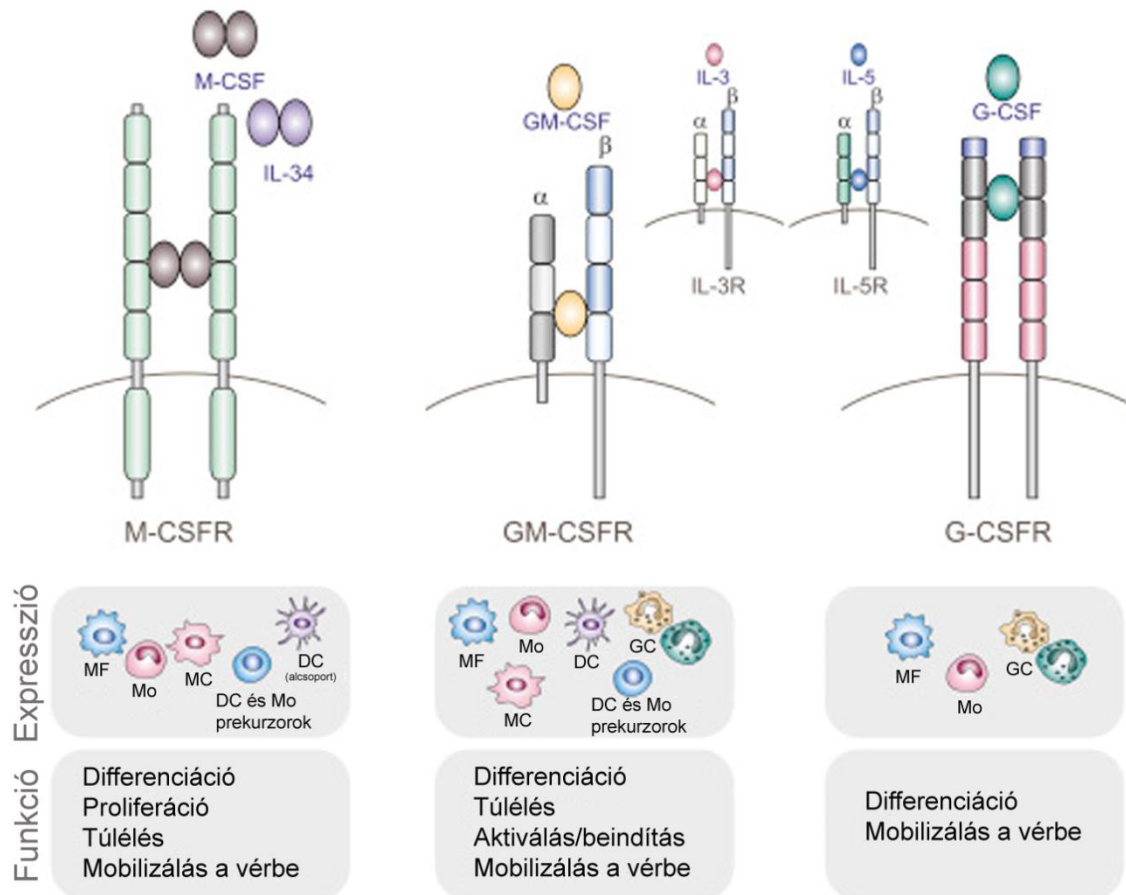




9. ábra. A GM-CSF hatásának összefoglaló ábrája az immunrendszer különböző sejtjeire. (69).

#### 2.4.3. A granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor receptorok (GM-CSFR)

A kolónia-stimuláló faktorok specifikus sejtfelszíni receptoraikon keresztül képesek hatásukat kifejteni a célsejtekre (10. ábra). A korábban említett G-CSF és M-CSF receptorai homodimerek, ráadásul a M-CSF receptora tirozin kináz aktivitással is rendelkezik. A másik két faktor, a GM-CSF, valamint a CSF (IL-3) receptorai - továbbá az IL-5 receptora is - ezzel ellentétben heterodimerek, és az intracelluláris jelátvitel beindításáért felelős  $\beta$  receptor alegységük közös (63, 70).



**10. ábra. A különböző kolónia-stimuláló faktorok és receptoraik, valamint kifejeződésük és hatásuk az immunrendszer sejtjeire.** Az M-CSFR egy homodimer, amely a mononukleáris fagocita rendszer legtöbb tagján expresszálódik, kanonikus ligandja a M-CSF, de kötni tudja az IL-34-et is. A GM-CSFR-t hasonlóképpen számos sejt képes expresszálni, viszont ez egy heteromer receptor komplex. A receptor  $\beta$  alegysége dimert tud formálni a GM-CSF-specifikus  $\alpha$  láncsal vagy az IL-3 és -5 specifikus  $\alpha$  receptor alegységével is. A G-CSFR, az M-CSFR-hez hasonlóan szintén homodimer, és elsősorban granulocitákon expresszálódik. (MF, makrofág; Mo, monocita; MC, monocita eredetű sejt; DC, dendritikus sejt; GC, granulocita). (70).

A GM-CSF citokin receptora egy heteromer komplex, amely egy ligand-specifikus és ligand-kötő, kb. 60-80 kDa molekulásúlyú  $\alpha$  alegységből (GM-CSFR  $\alpha$ , CD116) és egy 120-140 kDa molekulásúlyú, szignáltransdukcióért felelős  $\beta$  alegységből áll (GM-CSFR  $\beta$ , CD131) (65). Mind az  $\alpha$ , mind a  $\beta$  lánc I-es típusú transzmembrán glikoproteinek, amelyek jól azonosíthatóak a citokin-receptor homológia modulok (CRM) alapján, és két fibronektin III-as típusú domént tartalmaznak (65). A GM-CSFR  $\alpha$  alegységnek 8 ismert izoformája közül, csak az  $\alpha 1$  és  $\alpha 2$  vesz részt valamilyen

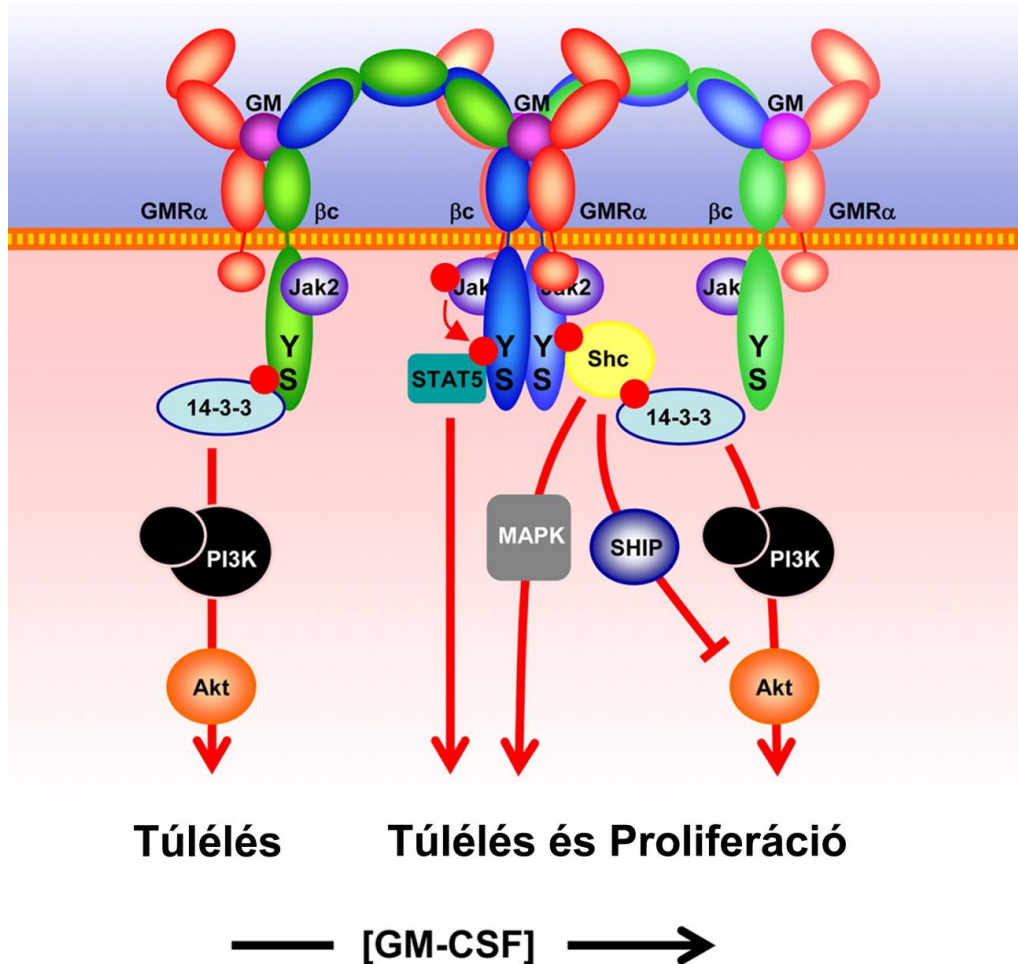
jelátviteli útvonal indukálásában. Az  $\alpha$  alegység habár ligand-specifikus, igen kis affinitással köti a GM-CSF fehérjét, ez a kötési hatékonyság azonban jelentősen megerősödik GM-CSFR  $\beta$  expresszió mellett. A GM-CSFR  $\beta$  általában kontitútván expresszálódik a sejtek felszínén (65, 71). Az  $\alpha$  láncnak ugyan nincs közvetlen szerepe a különböző jelátviteli utak indukálásában, de jelentőségét mutatja, hogy teljes intracelluláris régiójának deléciója sejtnövekedési és differenciálódási defektusokat, hiányokat okoz (65). A GM-CSFR igen kis mennyiségben van jelen (100-1000 molekula/sejt) a hematopoetikus sejtek (pl. granulociták, makrofágok, limfociták, monociták, megakariociták, plazma sejtek, dendritikus sejtek) plazmamembránján, azonban a nem-vérképző őssejt eredetű sejtek felszínén is expresszálódik (pl. endothel sejtek, oligodendrociták, mikroglia, asztrociták, epitheliális sejtek) (65).

#### 2.4.4. A GM-CSF és receptora által szabályozott jelátviteli útvonalak

A GM-CSF receptor komplex aktivációja a ligand megkötésén, a kétféle alegység teljes intracelluláris régióinak meglétén, a receptor dimerizációján és a tirozin aminosavak transzfoszforilációján alapszik (65, 72). Ennek a receptor komplexnek azonban nincs belső, úgynevezett „intrinsic” tirozin kináz aktivitása, ezért a későbbi transzdukciós lépésekhez elengedhetetlenül szükséges egy nem receptor-típusú kináz, a Janus Kináz 2 (JAK2). A JAK2 csakis a  $\beta$  alegységhez képes kapcsolódni, és fő feladata annak transzfoszforilálása (72). Régóta ismert, hogy a  $\beta$  láncok valójában homodimer formában vannak jelen, azonban intracelluláris régióik körülbelül 120 Å távolságra vannak egymástól, és emiatt az alegység transzfoszforilációja nehéz feladat (65). Röntgenkristallográfias módszerrel viszont sikerült kimutatni, hogy két hexamer GM-CSF ligand-receptor komplex (2  $\alpha$ , 2  $\beta$  és 2 GM-CSF ligandum) „head-to-head” orientációban képes összeszerelődni, és így létre tud hozni egy dodecamer komplexet. Ezen konformáció segítségével két  $\beta$  lánc citoplazmatikus farki régiója megközelítőleg 10 Å távolságra lesz egymástól, lehetővé téve ezzel a JAK2 általi transzfoszforilációt, és a különböző jelátviteli utak beindítását (71, 72).

Az aktiválódott JAK2 különböző tirozin (Y577, Y612, Y695, Y750, Y806, Y866) (73), és szerin aminosavakon képes foszforilálni a receptor  $\beta$  alegységet (72) (**11. ábra**). A kialakult foszforilációs mintázatnak pedig igen döntő szerepe van abban, hogy milyen irányban indul el a jelátvitel. A tirozinon foszforilált GM-CSFR  $\beta$  például az Src

homolgy 2 és foszfortirozint kötő doménnel rendelkező fehérjéket toborozza, amelyek kanonikus JAK-STAT, Ras-MAPK és PI3K útvonalakat indukálnak (72, 73). Az azonban igen fontos kérdés, hogy mi szabályozza a receptorokon kialakult foszforilációs mintázatot. Irodalmi adatok szerint döntő tényező a GM-CSF ligand koncentrációja; ugyanis a 10 pM-nál alacsonyabb GM-CSF koncentráció a receptor  $\beta$  alegység 585. szerinjének (Ser585) foszforilációját eredményezi, amely csakis a sejtek túlélésért felelős útvonalakat képes indukálni. Ezzel ellentétben, 10 pM-os vagy annál nagyobb GM-CSF koncentráció esetén az 577. tirozin foszforilálódik a  $\beta$  láncon, amely túlélési és proliferációs jelátviteli folyamatokat is be tud indítani (72). A kétféle foszforilációs forma kölcsönösen kizárja egymást, és időrendben először mindig a Ser585 foszforilációja következik be. A tirozin foszforilációjának hiányában a receptor  $\beta$  alegységekhez asszociált JAK2 molekulák kellően messze vannak egymástól, így nem lehetséges a transzfoszforiláció mechanizmusa, viszont lehetővé teszi az említett szerin aminosav foszforilációját és a sejt túlélési folyamatokat szabályozó útvonalak aktiválását (72).



**11. ábra. A GM-CSF által indukált jeltáviteli utak összefoglaló ábrája.** Az ábra bal oldalán az a 14-3-3/PI-3-kináz túlélési útvonalat követhetjük nyomon, amelyet alacsony pM-koncentrációban jelen lévő GM-CSF indukál a receptor  $\beta$  Ser585-ös foszforilációján keresztül. A GM-CSF magasabb koncentrációban azonban nemcsak túlélésért, de proliferációért is felelős jeltávitteleket is képes indukálni különböző tirozinokon foszforilált  $\beta$  receptora révén. (Jak-STAT, Ras-MAPK, PI3K). (72).

A GM-CSF citokin a klasszikus JAK-STAT útvonalon keresztül számos jelátalakító és aktiváló transzkripciós faktor (STAT) aktiválását képes indukálni (73). A JAK2/STAT5 kanonikus útvonal során a JAK2 transzfoszforilálja a GM-CSF receptor  $\beta$  alegységét, leggyakrabban az 577-es pozícióban lévő tirozinján. A STAT5 foszforilációjáért szintén a JAK2 felel, de az Src kinázok is képesek azt aktiválni (73). A STAT5 konzervált tirozin aminosaván történő foszforilációja során olyan konformációváltozás jön létre, amely lehetővé teszi a homodimerek vagy heterodimerek kialakulását (73). Ezek a dimerek, aztán DNS-kötő és transzkripciót szabályozó

képességgel bírnak, bejutnak a sejtmagba, ahol funkcionális transzkripciós faktorokként működnek (73). Specifikus DNS elemekhez képesek kötődni, így szabályozzák a sejtek túléléséért, proliferációjáért és differenciálódásáért felelős gének transzkripcióját (65).

## 2.5. Az autofágia

### 2.5.1. Az autofágia rövid története, bemutatása

Az autofágia görög eredetű szó, amely az önmagát (auto) emésztő (phagy, phagein) szavakból tevődik össze, jelentése: önemésztés (74). Az autofágia kifejezést Christian de Duve alkotta és hozta köztudatba a CIBA Foundation szimpóziumán 1963-ban (75, 76). A lizoszómák felfedezése (1955), - amelyért de Duve 1974-ben Nobel-díjat kapott - vezetett az autofágia folyamatának felismeréséhez is. Az autofágia nevét morfológiai megfigyelések útján kapta: patkány májsejtek lizoszómáit tanulmányozták elektronmikroszkóp segítségével, s közben citoplazma maradványokat, illetve sejtorganellumokat tartalmazó vezikulákat találtak a sejtekben (76).

Az autofágia nagyon erősen konzervált, celluláris újrahasznosítási folyamat, amely minden eukarióta sejtben lejátszódik. A citoplazmatikus fehérjék, különféle makromolekulák és sejtorganellumok lebontása, és a keletkezett bomlástermékek újrahasznosítása révén az autofágia igen fontos szerepet játszik számos biológiai folyamatban, a sejtek túlélésében és fennmaradásában, szabályozása alatt tartja a sejtek alapvető életfunkcióit. Ennek megfelelően a folyamat bármilyen diszfunkciója számos betegség kialakulásához járul hozzá (77). Korábban úgy vélték, az autofágia a programozott sejthalál csoportjába tartozik, és II-es típusú sejthalál formának is nevezték. Mára már azonban nyilvánvalóvá vált, hogy az autofágia, mint kifejezés nem csupán a sejthalálhoz vezető egyik út, hanem sokkal inkább egy összetett, degradatív celluláris folyamat (78). Hagyományosan a tápanyaghiányos vagy éhezési körülmények celluláris válaszaként ismerték az autofágiát, az utóbbi években végzett vizsgálatok azonban azt mutatták, hogy az autofágia a stresszre adott általános celluláris válasz. Érdekes módon, a kísérleti körülmények, legfőképpen a stressz szintjének függvényében, az autofágia közvetlenül indukálni tudja a sejtek túlélését vagy a sejtek halálát is (74) (**12. ábra**). Amellett, hogy számos fejlődési és differenciációs folyamat során nélkülözhetetlen az a celluláris megújítás, amelyet az autofágia biztosít (79), a

közelmúltban végzett vizsgálatok kimutatták, hogy alapvető szerepet játszhat a gyulladási folyamatokban is (80–82).



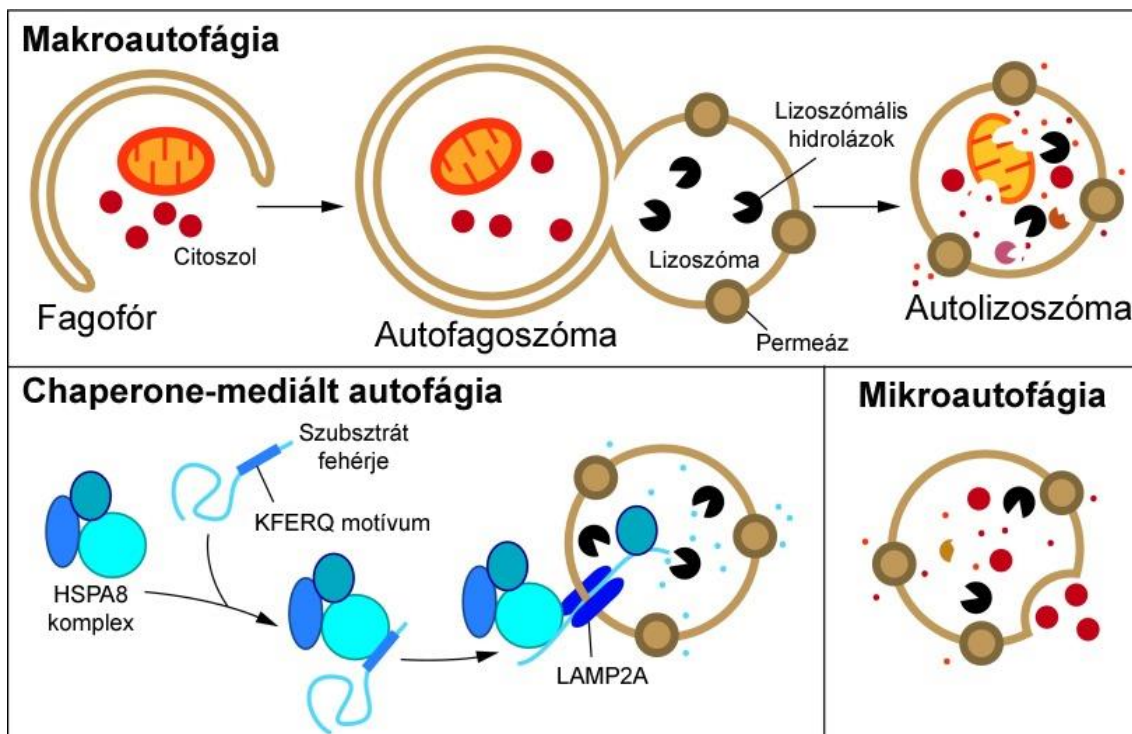
**12. ábra. Az autofágia lehetséges végkimenetelei a sejtet érő stressz és az autofágia intenzitásának függvényében.** A stressz korai szakaszában általában egy alap intenzitású autofágia indukálódik, amely citoprotektív hatású, és a sejtek túlélését eredményezi. Ha azonban a sejtet érő stressz súlyos és hosszan tartó, akkor nagyon intenzív, túlzott aktivitású autofágia indul el, amely a sejt károsodásához és halálához vezethet. (74).

#### 2.5.2. Az autofág folyamatok osztályozása

Emlős sejtekben három elsődleges típusú autofág folyamatot különböztetünk meg (**13. ábra**), amelyek morfológiáját és molekuláris szabályozásukat tekintve ugyan különböznek, de végső kimenetelük minden esetben a lebontandó cargo lizoszómákba való juttatása és lebontása (77). Ezen három típus a mikroautofágia, a makroautofágia, valamint a chaperone-mediált autofágia (CMA) (74, 77).

Mikroautofágia során a citoplazmatikus tartalom közvetlen felvétele történik a lizoszómákba a lizoszómális membrán invaginációjával vagy deformációjával. Mivel azonban nagyon kevés módszer áll rendelkezésre ahhoz, hogy részleteiben

tanulmányozzák a folyamatot, elég keveset tudunk még a mikroautofágiáról (77). A chaperon-mediált autofágia ellentétben a mikro- és makroautofágiával, nagyon specifikus, és szelektíven végzi a nem feltekeredett vagy hibásan feltekerett, úgynevezett „unfolded” fehérjék lizoszómbákba történő transzportját. A nem feltekerett fehérjék ugyanis tartalmaznak egy KFERQ konszenzus szekvenciát, amelyet a CMA egyik központi szereplője, a HSPA8/HSC70 hőssokk fehérje más ko-chaperonokkal együtt felismer. Ezután a HSPA8 a lizoszóma felé szállítja, ahol a membrán-asszociált LAMP2A receptorokon keresztül a fehérje bejut a lizoszóma lumenébe, és degradálódik. A CMA rendszerével nagyon sokféle fehérje lebontásra kerül, beleértve transzkripciós faktorokat, kalcium- és lipid-kötő fehérjéket, glikolitikus enzimeket, proteasóma alegységeket vagy vezikuláris transzportfehérjéket (77). A makroautofágia a másik két típussal szemben egy *de novo* keletkező, kettős-membránnal határolt egyedi sejtorganellum, az autofagoszóma segítségével szállítja az általa körülhatárolt, és bekebelezett cargót lizoszómális lebontásra (76, 77). A továbbiakban az autofágia szóhasználat mindig a makroautofágiára utal.



**13. ábra. Az autofágia típusai.** A három külön csoportba sorolt autofág folyamat (mikro-, makroautofágia, chaperon-mediált autofágia), és ezen folyamatok során lejátszódó legfontosabb lépések. (77).



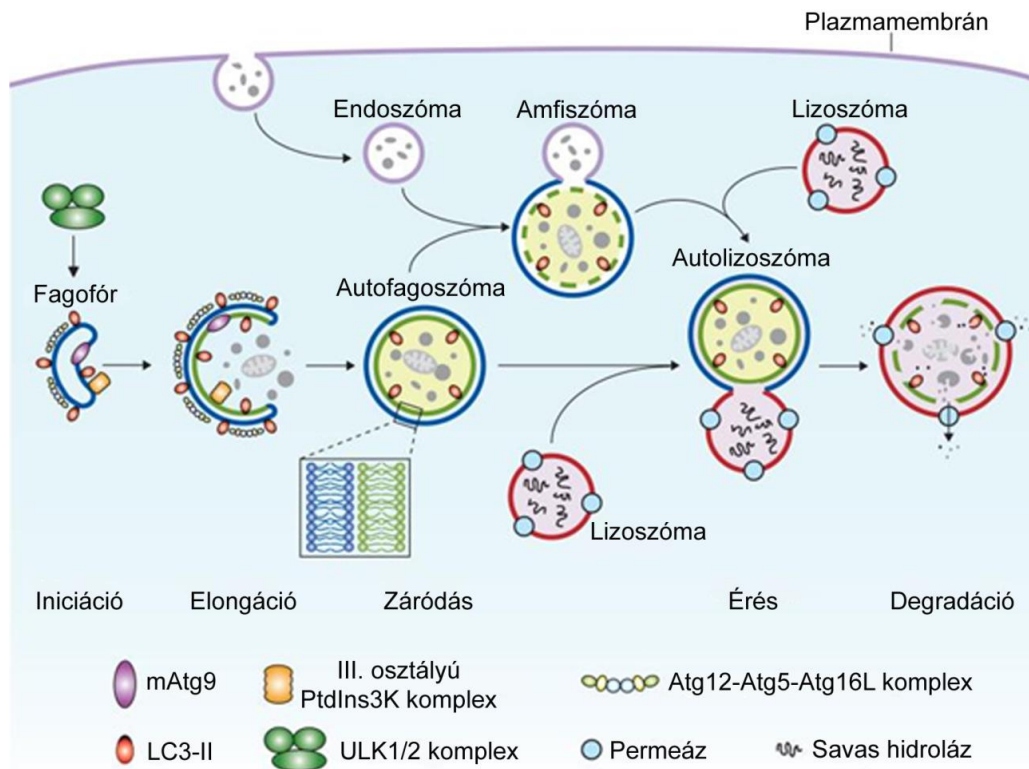
### 2.5.3. A makroautofágia folyamatának lépései és markerei

Az autofágia dinamikus folyamata lépésről-lépésre nyomon követhető a jellegzetes citoplazmatikus sejtorganellumai által, amelyek különböző markerek segítségével, valamint ultrastrukturálisan is jól azonosíthatók és megkülönböztethetők **(14. ábra)**.

Az egész folyamat egy csésze alakú vagy „C”-betűt formáló kettős membránszákkal kezdődik, amelyet izoláló membránnak, vagy más néven fagofórnak neveznek (83). Ez a membrán elkülöníti és körülhatárolja a citoplazma egy kis részletét a később lebontásra szánt makromolekulákkal, fehérjékkel és sejtalkotókkal együtt. Általánosan elfogadott tézis, miszerint a fagofórok egy már létező membránon történő specifikus faktorok nukleációjával keletkeznek, *de novo*. Élesztőben a fagofór membránja az úgynevezett pre-autofagoszómális struktúrából (PAS) származik, amely közel van az élesztő vakuólumához (84). A magasabb rendű eukariótákban a sejtek citoplazmájában különböző helyeken történhet fagofór-nukleáció, de ma már egyre inkább elfogadott tény, hogy egy bonyolult membránszerkezet, az úgynevezett omegaszóma a később kialakuló fagofór nukleációs pontja - legalábbis éhezési körülmények között - (84). Az omegaszómat eredetileg endoplazmatikus retikulumhoz asszociált képletnek azonosították, amely PtdIns3P-kötő kettős FYVE domént tartalmazó fehérje 1 (DFCP1, más néven ZFYVE1) pozitív. Az intracelluláris membrán eredetű omegaszóma képződéséhez a III. osztályú PtdIns3-kináz (PI3KC3, élesztőben Vps34) szükséges, és ez felelős egy autofágia-specifikus komplex kialakításáért további fehérjékkel együtt (lásd később) (84).

A fagofór nukleációja után megkezdődik az elongációs folyamat, amelynek során a fagofór membránja növekedésnek indul, majd végül a két nyitott vége összetalálkozik, lezáródik, így alakítva ki egy kettős membránnal határolt vezikulumot, amelyet autofagoszómának nevezünk (83). Az autofagoszómák mérete függ a lebontásra szánt anyag típusától és a vizsgált mintától is. Átmérőjük jellemzően élesztőkben körülbelül 0,3/0,4-0,9  $\mu\text{m}$ , emlős sejtekben pedig 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  körüli (77, 83). Élesztőkben becslések szerint az autofagoszómák képződése igen gyors, körülbelül 4-5 percet vesz igénybe, a teljes autofág ciklus pedig 7-9 perc. Emlős sejtekben 5-10 percre tehető az autofagoszómák kialakulási ideje (83). A fagofórok által létrehozott autofagoszómák a legtöbb esetben mielőtt fuzionálnának lizoszómákkal, érési folyamaton mennek

keresztül, amely során összeolvadhatnak korai (85), illetve késői endoszómákkal is (86–88). Ezt a folyamatot heterofágiának is szokták nevezni, mivel ekkor a sejt nemcsak saját anyagait bontja le autofágiával, hanem az endocitotikus útvonalak által bekerült, a környezetből felvett idegen cargo is autofágia révén jut a lizoszómákba. Az így kialakult, endoszómával fuzionált autofagoszómát amfiszómának nevezzük (89). Az autofagoszómák érése tehát egy nagyon összetett, több lépésből álló folyamat, amely kapcsolatban áll az endocitotikus útvonalakkal. Az érett autofagoszómák vagy az amfiszómák ezután közvetlenül fuzionálhatnak lizoszómákkal (90–92), - vagy lizoszóma-szerű vakuólumokkal élesztőben -, és létrehozzák az úgynevezett autolizoszómákat, amely eredményeképp az autofagoszómák tartalma és belső membránja degradálódik a lizoszómális hidrolázok által (83, 89). A folyamat legvégén a lizoszómális lebontás után visszamaradó makromolekulák kijutnak a citoplazmába, hogy újra felhasználhassa azokat a sejt (89).



**14. ábra. Az autofágia folyamatábrája.** Az egymást követő lépések sorozatához nélkülözhetetlenek azok az autofágia-kapcsolt, specifikus fehérjék (Atg), amelyek funkcionális csoportokat létrehozva szabályozzák az autofágiára jellemző sejtorganelumok képződését és érését (lásd később). (75).

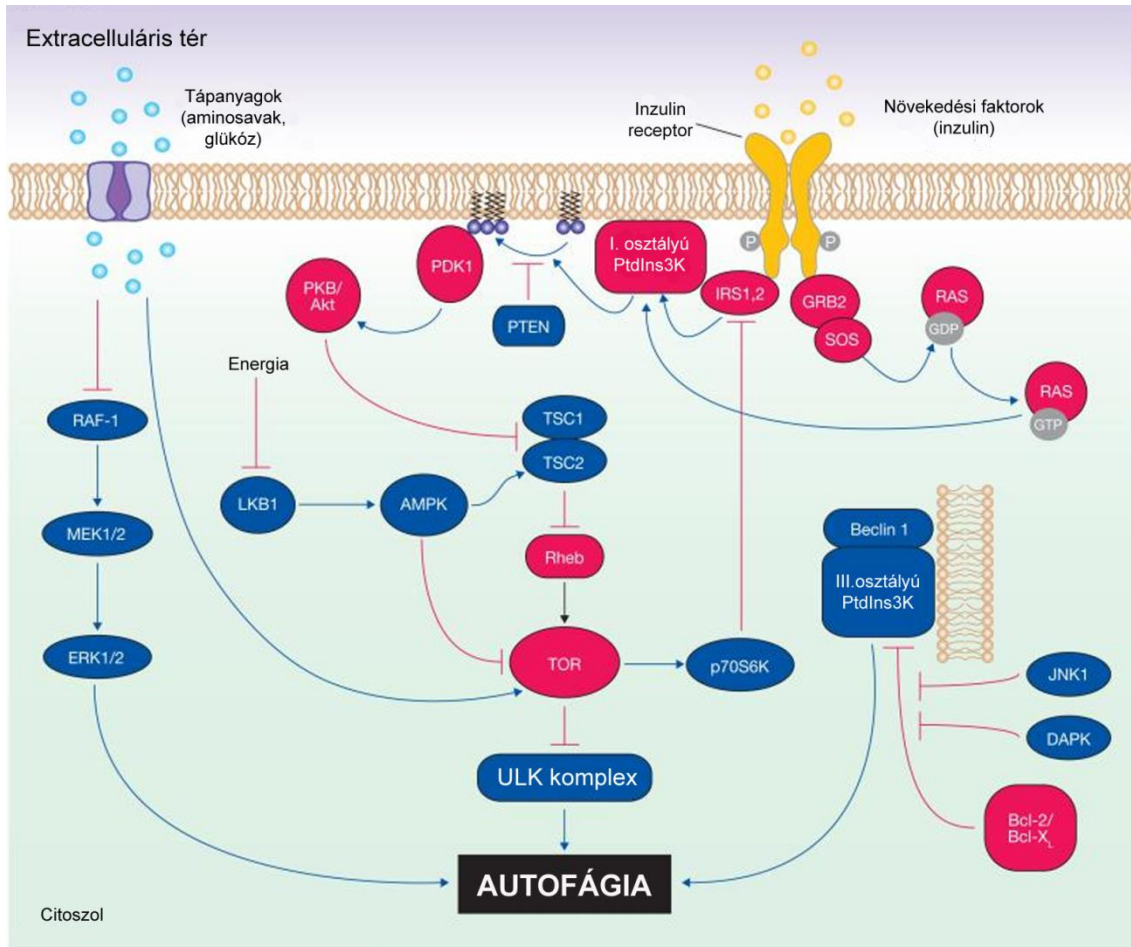
Ahogy az már korábban említésre került, az autofágia jellegzetes sejtalkotói nem csak morfológiailag, hanem molekuláris markerek segítségével is jelölhetőek és azonosíthatóak. Az 1990-es években élesztőkön végzett genetikai manipulációs kísérletek nagy áttöréshez vezettek (75). Az úgynevezett „autophagy-related”, autofágia-kapcsolt (Atg) gének felfedezése, majd később egységes nomenklátúra alapján történő rendszerezése hatékony genetikai és molekuláris eszköztárat nyújtott az autofágia részletes feltérképezéséhez (75, 93). Az elsőként azonosított Atg génről, az Atg1-ről (akkori nevén Apg1p) szóló publikáció 1997-ben született meg (75, 94). Eddig több, mint 35 Atg fehérjét kódoló gént azonosítottak élesztőben. Ezek közül legalább 15 olyan központi szerepű Atg gén van (Atg10, 12-14, 16, 18), amelyek nélkülözhetetlenek mind az éhezés által indukált, mind pedig a szelektív autofágia folyamatához (mitofágia, pexofágia), erősen konzerváltak emlősökben, és számos ortológ megfelelőjük van magasabb rendű eukariótákban (76, 83).

Az autofágia-eredetű gének által kódolt fehérjéket 4 funkcionális alcsoportba lehet sorolni. Az első csoport az iniciációs vagy másnéven Atg1 (élesztő)/ULK (emlős) komplex (Atg1, Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 és Atg31), amely felelős a fagofórok kialakulásáért (nukleáció), és szabályozza az autofagoszómák képződését. A második funkcionális csoportba az Atg9 az Atg2, és az Atg18 (emlősökben WIPI 1/2) fehérjék tartoznak, amelyek fontos szerepet játszanak a formálódó fagofór membránépítésében. A harmadik csoport az úgynevezett III. osztályú foszfatidil-inozitol-3-kináz (PtdIns 3-kinase, PtdIns3K, röviden PI3K) komplex, amelynek tagjai (Vps34, Vps15, Vps30/Atg6/Beclin-1, és Atg14) a fagofór nukleációs helyén működnek, részt vesznek a PI-3-P-kötő fehérjék toborzásában, szükségesek az iniciációs és az elongációs lépésekhez is. A negyedik csoportba az Atg12 (Atg5, 7, 10, 12 és Atg16) és az Atg8/LC3 (Atg3, 4, 7, és Atg8) ubiquitin-szerű konjugációs rendszerei tartoznak, amelyek az autofagoszóma képződésében, és a membrán növekedésében játszanak igen fontos szerepet (74, 76, 77).

Az autofágia során létrejövő összetett molekuláris gépezet azt sugallja, hogy a folyamat szabályozása rendkívül bonyolult, és több jelátviteli útvonalon keresztül történhet. Valójában a legtöbb fontos jelátviteli mechanizmus bizonyítottan szabályozza az autofágia folyamatát különböző stressz körülmények között, mint például a táplálékhiány, az ER stressz vagy az energia stressz. Ezek az útvonalak

kereszteződhetnek és együttesen szabályozhatják a folyamatot az autofág kaszkád elejétől (iniciáció) a végéig (lizoszómális fúzió) (74).

Az úgynevezett TOR komplex kulcsfontosságú szerepet játszik az autofágia regulálásában, hiszen központi helyen szerepel a PI3K-Akt-mTOR útvonalban, az aminosav-függő és energia szintet szabályozó jelátviteli utakban is. Az mTOR komplex aktiválása bármely útvonalon keresztül az autofágia gátlását eredményezi. Megfelelő mennyiségű aminosav hiányában a Raf1-MEK1/2-ERK1/2 jelátviteli kaszkád aktiválódik, amely indukálni tudja az autofág folyamatokat. A sejtek energiahiánya az AMP-aktivált protein kináz (AMPK) foszforilálásához és aktiválásához vezet, amely közvetetten inaktiválja a TOR komplexet, így szintén indukálni tudja az autofágiát. A p70S6K kináz, amely az mTOR egyik szubsztrátja negatív visszacsatolással képes biztosítani egy alap autofág aktivitást, amely nélkülözhetetlen a sejtek homeosztázisához. A JNK1 és a sejthalál-asszociált protein kináz (DAPK) fehérjék közreműködésével pedig a Beclin-1-asszociált PI3K komplex szabadul fel az anti-apoptotikus fehérjék (Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>) gátlása alól, amely így serkenteni tudja az autofágiát (75), **(15. ábra)**.



**15. ábra.** Az autofágiát szabályozó jelátviteli utakat összegző ábra. Sematikusabrázolja az autofág folyamatok összehangolásáért felelős legfontosabb jelátviteli mechanizmusokat (PI3K-Akt-mTOR; Raf1-MEK1/2-ERK1/2; AMPK stb.). (75).

Mivel az autofágia számos jelátviteli útvonal által kontrollált folyamat, ezért jó néhány olyan terápiás céllal is felhasználható szer létezik, amelyek aktiváló- vagy gátlószerként regulálni tudják az autofág folyamatokat. Aktivátorként legtöbbször az mTOR komplexet gátló, vagy az ER stresszt indukáló szereket szoktak alkalmazni, mint például a rapamycin vagy brefeldin A. Gátlószerként a leggyakrabban alkalmazott szereket az auto(fago)lizoszóma képződését akadályozzák meg valamilyen úton-módon, mint például a 3-metiladenin vagy a bafilomycin A1 (95).

### 3. Célkitűzések

Laboratóriumunkban végzett korábbi munkáinkban igazoltuk, hogy Freund adjuváns indukálta gyulladás során, illetve *in vitro* körülmények között végzett kezelések hatására a patkányok hashártyájának mesothel sejtei elveszítik hám tulajdonságaikat és mesenchymális, makrofág-szerű sejtekké differenciálódnak (EMT II). Annak megválaszolására azonban, hogy ezen átalakulás során végbemenő molekuláris folyamatok hogyan zajlanak, és ezek a szabályozások milyen kapcsolatban állnak egymással - a TGF- $\beta$  és ösztrogén egymásra és a differenciációs folyamatokra gyakorolt hatásán kívül (9, 96) - nem volt adatunk. Nem volt ismeretes továbbá az sem, hogy a gyulladás lecsengése után a regeneráció során végbemenő morfológiai változások hátterében milyen molekuláris mechanizmusok állnak. Doktori munkámban tehát ezen kérdések megválaszolását tűztem ki célul.

- ❖ Előzetes vizsgálataink során kimutattuk, hogy az EMT során a hámsejtek makrofág markereket (pl. ED1) expresszálnak, gyulladásos citokineket (GM-CSF, TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ ) termelnek, és receptoraikat expresszálják (67, 96, 97). *In vitro* kísérleteink alátámasztották, hogy a GM-CSF és a TGF- $\beta$  külön-külön, és kombinált kezelésként alkalmazva hasonló fenotípusos átalakulást indukál, mint a Freund adjuváns. Kísérleteink során az is egyértelművé vált, hogy a GM-CSF jelátviteli folyamatához a receptor-ligand internalizációja elengedhetetlen, mivel azt tapasztaltuk, hogy a GM-CSF kezelés a sejtfelszíni vezikulák számának csökkenésével párhuzamosan indukálta a mesenchymális átalakulást, és fokozta a sejtek ED1 expresszióját (98). Amikor dynasore kezeléssel - dinaminnal gátlása révén - gátoltuk a caveolák és clathrin-burkos vezikulák lefűződését a mesothel sejtek nem expresszálták az ED1-t, nem történt meg a mesenchymális átalakulás (67, 98).
- ◆ Jelen munkámban arra kerestem választ, hogy a GM-CSF receptor  $\beta$ , - amely felelős a jelátviteli utak beindításáért -, hogyan expresszálódik a mesothel sejtekben, milyen útvonalon internalizálódik, és milyen endocitotikus vezikulákban (korai, késői és reciklizáló endoszóma) mutatható ki a jelátviteli folyamat során. Ebből a célból Western blot és immuncitokémiai vizsgálatokkal, továbbá statisztikai elemzéssel vizsgáltuk a GM-CSF receptor  $\beta$

expresszióját, és kolokalizációját különféle endocitotikus markerekkel (Cav-1, EEA1, Rab7, Rab11a).

- ❖ Ezt követően kísérleteink során azt vizsgáltuk, hogy a GM-CSF milyen jelátviteli útvonalat aktiválva fejt ki hatását. Ismeretes, hogy a GM-CSF jelátvitel a STAT5 transzkripciós faktor aktiválásán keresztül is képes celluláris választ indítani. Ezért immuncitokémiai és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk, hogy különböző kezelések hatására hogyan változik ezen transzkripciós faktor aktív formájának expressziója és lokalizációja a mesothel sejtekben.
- ❖ Ismeretes, hogy a jelátviteli utak általában nem csak egyszerűen lecsengenek, hanem szabályozott mechanizmusok révén gátlódnak is egy vagy akár több negatív regulátor molekula közreműködésével, amelyek például degradatív útvonalra terelve a szignál transzdukcióért felelős receptort leállítják a jelátvitelt (lásd I-Smad fehérjék). Esetünkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a mesothel sejtekben expresszálódik-e olyan negatív regulátor, amely gátolni képes a GM-CSF jelátviteli folyamatát. Ebből a célból immuncitokémiai vizsgálatokkal próbáltuk kimutatni a JAK-STAT útvonal leállításában fontos szerepet játszó SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) expresszióját.
- ❖ Korábbi morfológiai és morfometriai vizsgálataink azt mutatták, hogy a gyulladás alatt a hámsejtek térfogata, sejtalkotóik száma drasztikusan megnő, majd a gyógyulás beindulásával fokozatosan csökken, amikor jelentős számú autofág sejtalkotó azonosítható a mesothel sejtekben. A folyamat végeredményeként a mesothel sejtek visszanyerik az eredeti, laphám sejtekre jellemző méretüket és morfológiájukat (36). Arra kerestük tehát a választ, hogy az autofágia milyen szerepet játszik a mesothel sejtek regenerációjában.
  - ◆ Jelen munkámban céloom az autofágia molekuláris folyamatának részletes feltérképezése volt, ezért a gyulladás és a gyógyulás különböző időpontjaiban immuncitokémiai és biokémiai vizsgálatok segítségével követtük nyomon az autofágiában közvetett (Akt/p-Akt, mTOR/p-mTOR, EEA1, Rab7) és közvetlen (Beclin-1, LC3B) módon szerepet játszó markerek expresszióját.
- ❖ Az is nyitott kérdés volt, hogy mi az a külső, a környezetből érkező esetleges szignál, amely segíti a mesothel sejtek gyógyulását, és visszafordítja az EMT

folyamatát. Ebből a célból az irodalomban ismert, MET-et indukáló faktorokkal, a BMP fehérjékkel végeztünk immuncitokémiai és Western blot vizsgálatokat.

- ❖ Végeztük annak igazolására, hogy az autofágia valóban kulcs szerepet játszik az eredeti laphám morfológia visszaállításában, vizsgáltuk a regeneráció folyamatát autofágiát gátló bafilomycin A1 jelenlétében. *In vivo* kísérletekben bafilomycin A1 intraperitoneális injektálásával akadályoztuk meg az autofagoszómák és lizoszómák fúzióját, savasodását; és morfológia vizsgálatokkal (fény- és elektronmikroszkópia) követtük nyomon az autofágia és a regeneráció folyamatát.



## 4. Módszerek

### 4.1. Állatok

*In vivo* kísérleteinkhez 60-70 napos, 200-300 gramm súlyú, hím Sprague-Dawley patkányokat (Charles River Research Models and Services, Sulzfeld, Baden-Württemberg, Németország) használtunk. (Állatkísérleti engedély: SEMÁB-B/098/2015).

### 4.2. Felhasznált anyagok

- ❖ **Freund adjuváns:** Akut peritonitisz kiváltásához 1 ml komplett Freund adjuvánst - inaktív *Mycobacterium tuberculosis* szuszpenziót tartalmazó ásványi olaj (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missouri, USA) - injektáltunk az állatok hasüregébe.
- ❖ **Bafilomycin A1:** Az autofágia gátláshoz 0,25 mg bafilomycin A1-et (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas, USA) használtunk, amelyet 2,5 ml DMSO (dimetil-szulfoxid) és 2,5 ml desztillált víz 1:1 arányú keverékében feloldva injektáltunk az állatok hasüregébe (Santa Cruz Biotechnology Inc. honlapján elérhető információk alapján), és különböző kezelési időtartamokban vizsgáltuk a bafilomycin hatását (*in vivo*). Kontroll állatoknál 2 és 4 órás, a 3 napos gyulladáshoz 4 órás, az 5 napos gyulladáshoz 24 órás kezeléseket alkalmaztunk, amelyek során 2-2,5 ml bafilomycin A1/DMSO/desztillált víz elegyét adtuk a patkányoknak. A 8 napos gyulladáshoz 4. napján oltottuk az állatokat 2,5 ml bafilomycin A1/DMSO/desztillált víz elegyével. Majd kombináltuk a kezeléseket, és tekintettel arra, hogy a gyulladás alatt többször oltottuk az állatokat, csökkentettük az injektált bafilomycin A1 mennyiségét. 2 patkányt a gyulladás 4. napjától kezdve minden nap oltottunk (4-7.-ig napig) 1-1 ml bafilomycin A1/DMSO/desztillált víz elegyével. 2 állatot csak az 5. és 6. napon; 2 másik állatot pedig csak a 6. és a 7. oltottunk 1,5-1,5 ml bafilomycin A1/DMSO/desztillált víz elegyével. A bafilomycin A1-gyel végzett

vizsgálatokat és a különböző kísérleti állatcsoportokat az alábbi táblázat foglalja össze (**1. táblázat**).

**1. táblázat. A bafilomycin A1 kezelések összefoglaló táblázata.**

Csoportok	Freund adjuváns oltás	Bafilomycin A1 oltás száma	Bafilomycin A1 hatóideje
<b>CTR A</b>	-	1x	2h
<b>CTR B</b>	-	1x	4h
<b>D3</b>	+	1x	4h
<b>D5</b>	+	1x	24h
<b>D8 A</b>	+	1x	96h
<b>D8 B</b>	+	4x	96h
<b>D8 C</b>	+	2x	72h
<b>D8 D</b>	+	2x	48h

#### **4.3. A kísérleteink során használt ellenanyagok**

A fagyasztott félvékony (semi-thin: s-t) és ultravékony (ultrathin: ut) metszeteken elvégzett immuncitokémiai (IC) jelölésekhez, valamint a Western blot (WB) vizsgálatokhoz a specifikus antigén-antitest kötéseken alapuló immunkomplexeket az elsődleges antitestekre faj specifikus, szekunder ellenanyagok használatával tettük láthatóvá. A munkám során használt valamennyi primer illetve szekunder antitestet, és azok megfelelő hígításait az alábbi táblázat foglalja össze (**2. táblázat**).

2. táblázat. A munka során használt antitestek összefoglaló táblázata.

Név	Faj; Típus	Hígítás	Gyártó
<b>Alexa Fluor 488/555</b>	kecske anti-nyúl, anti-egér	IC (s-t): 1:200	Molecular Probes <sup>®</sup> , Leiden, Hollandia
<b>anti-Akt</b>	nyúl, poliklonális	WB: 1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Danvers, Massachusetts, USA
<b>anti-Beclin-1</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:200 WB: 1:250	Novus Biologicals <sup>®</sup> , LLC, Littleton, USA
<b>anti-BMP4</b>	nyúl, poliklonális	WB: 1:200	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-BMP7</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:200 WB: 1:100	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-BMPR2</b>	egér, monoklonális	IC (s-t): 1:100 WB: 1:500	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-caveolin-1</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:200	BD Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA
<b>anti-EEA1</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t,ut): 1:200 WB: 1:1000	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-GM-CSFR <math>\beta</math></b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t,ut): 1:250 WB: 1:100	Bioss, Woburn, Massachusetts, USA
<b>anti-Lamin A</b>	nyúl, poliklonális	WB: 1:250	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
<b>anti-LC3B-I/II</b>	nyúl, poliklonális	WB: 1:500	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Danvers, Massachusetts, USA
<b>anti-mTOR</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:100 WB: 1:250	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Danvers, Massachusetts, USA

<b>anti-p-Akt</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:50 WB: 1:250	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA
<b>anti-p-mTOR</b>	nyúl, monoklonális	IC (s-t): 1:50 WB: 1:250	Cell Signaling Technology®, Danvers, Massachusetts, USA
<b>anti-p-STAT5 (STAT5A Tyr694)</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:200 WB: 1:100	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
<b>anti-p-STAT5 (STAT5A S726 + STAT5B S731)</b>	nyúl, poliklonális	WB: 1:500	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-Rab11a</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t): 1:400	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-Rab7</b>	nyúl, poliklonális	IC (s-t,ut): 1:100 WB: 1:500	Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA
<b>anti-SOCS1</b>	kecske, poliklonális	IC (s-t): 1:400	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>anti-β-tubulin</b>	egér, monoklonális	WB: 1:1000	Millipore, Temecula, California, USA
<b>HRP-konjugált anti-beta aktin</b>	egér, monoklonális	WB: 1:20000	Abcam plc, Cambridge, Nagy-Britannia
<b>HRP-konjugált szekunder antitest</b>	kecske anti- nyúl, anti-egér	WB: 1:5000, 1:10000, 1:20000	Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA
<b>Protein A IgG (10,15 nm)</b>	-	IC (ut): 1:40	Cell Microscopy Centre, Utrecht, Hollandia
<b>Vectashield-DAPI</b>	-	IC (s-t): hígítatlanul	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA

#### 4.4. *In vivo* vizsgálatok

A mesothel sejtek vizsgálatához a Freund adjuváns kezelést követően különböző időpontokban (3, 5, 8, 11 nap) izolált mesenterium preparátumokat használtunk. Az állatokat rövid éter-narkózis alatt dekapitáltuk, majd a hasüregük felnyitása után a vékonybeleket rögzítő bélfodrot (mesenterium), valamint a gyomorhoz tartozó hashártya kettőzeteket preparáltuk ki. Ezután a mintákat fixáltuk és beágyasztuk (lásd később). Kontrollként a kezeletlen állatokból származó mesenterium preparátumokat használtuk. *In vivo* vizsgálatainkat háromszor ismételtük, egymástól független kísérletekkel (n=3).

#### 4.5. *In vitro* vizsgálatok

*In vitro* kísérleteinkhez kontroll patkányokból kinyert hashártyákat (a zsírszövet megtartásával) inkubáltunk steril körülmények között, DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nutrient Mixture F-12, Life Technologies™, Paisley, Nagy-Britannia) tenyésztői médiumban 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub> koncentráció mellett. A primer kultúrák DMEM/F12 médiumához marha szérum albumint (10%, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA), Penicillin-Streptomycint (1%, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Ausztria) és peritoneális mosófolyadékot (10%, kontroll állatok hasüregének 2 ml steril PBS-sel történő mosásakor kinyert folyadék) adtunk. A mesothel sejtek irányított, makrofággá való differenciáltatásának céljából a primer mesenterium tenyészeteket 1 ng/ml GM-CSF-fel (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) kezeltük (médiumban oldva) 1 és 24 órán át. Néhány esetben a primer kultúrákat 80 µM dynasore-ral (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) előkezeltük (1 óra), a dinamín-függő endocitotikus folyamatok gátlása céljából (99). Ezután a médiumot GM-CSF-fel kiegészítettük, és a tenyészeteket 24 órán át inkubáltuk. Egy kísérleti sorozatban párhuzamosan, két Petri-csészében tenyésztettük és kezeltük a hashártyákat, és minden vizsgálatot öt alkalommal ismételtünk.

## 4.6. Morfológiai, fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok

### 4.6.1. A hashártya fixálása, előkészítése

A hashártya preparátumokat 2%-os glutáraldehid (GA, 0,1M kakodilát puffer, pH: 7,4) és 2%-os ozmium-tetroxid (OsO<sub>4</sub>, 0,1 M kakodilát puffer, pH: 7,4) 1:1 arányú keverékével fixáltuk jégen 1 órán át. (Az ozmium-tetroxidot fixálóként és kontrasztosítóként is használtuk a rutin transzmissziós EM-es eljárás során.) A fixálást követően a mintákat 0,1 M-os kakodilát pufferrel (pH: 7,4) mostuk (3 x 5 perc), majd a mesenterium környéki zsírszövetet eltávolítottuk. A kötelező mosások után a mintákat fokozatosan növekvő koncentrációjú, felszálló alkoholsorral víztelenítettük. A 30%- és 50%-os alkoholos kezelés (10-10 perc) után membránkontrasztosítás céljából a mintákat 1%-os uranil-acetátot tartalmazó 70%-os alkoholba tettük, és sötétben, 1 órán át, 4°C-on inkubáltuk; majd további 70%-, 80%-, 90%-, 96%-os, valamint az abszolút alkoholban inkubálva (10-20 perces időközönként cserélve) teljesen víztelenítettük. A dehidrációt követően a mintákat propilén-oxidba helyeztük 30 percre. Ezt követően propilén-oxid és araldit 2:1 (20-30 perc), 1:1 (20-30 perc), végül 1:2 (20-30 perc) arányú keverékével szobahőmérsékleten átittattuk, és 100%-os aralditban, kiöntő formákban 56°C-os termosztátba tettük. A minták orientációját minden esetben úgy végeztük, hogy a metszés során hosszanti metszési síkban tudtuk analizálni azokat. Fénymikroszkópos vizsgálatainkhoz a beágyazott mintáinkból Reichert ultrakriomikrotómmal (Bécs, Ausztria) félvékony metszeteket készítettünk, amelyeket azután toluidinkékkel festettünk meg. A metszeteket hagyományos fénymikroszkóppal (Carl Zeiss) vizsgáltuk, Zeiss AxioCam HRC kamerával fotóztuk, és Axiovision programmal analizáltuk. Elektronmikroszkópos vizsgálatainkhoz a polimerizálódott blokkokból ultravékony metszeteket készítettünk, amelyeket uranil-acetáttal és ólom(II)-nitráttal (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) kontrasztoltunk, majd Hitachi H-7600-as (Tokió, Japán) transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltunk.

### 4.6.2. Elektronmikroszkópos immuncitokémiai vizsgálatok

A 4%-os (1 óra, szobahő), majd 1%-os PFA-ban (foszfát pufferes fiziológiás sóoldat PBS-ben oldva) fixált mintákat zselatinba ágyasztuk, majd a zselatinba ágyazott mesenterium preparátumokból kb. 3 x 3 mm-es, apró blokkokat formáltunk, és

krioprotekció céljából 2,3 M-os cukor oldatban (1 éjszakán át) inkubáltuk. A blokkokat ezt követően alumínium pinekre tapasztattunk ki, és folyékony nitrogénben lefagyasztva tároltuk, majd metszettük. A fagyasztott ultravékony (70 nm) metszeteket Leica Ultracut S fagyasztó ultramikrotóm (Bécs, Ausztria) segítségével készítettük (-110°C-on), majd 1,8%-os metilcellulóz és 2,3 M-os cukor oldat 1:1 arányú keverékével felvettük, és hexagonális gridekre helyeztük. Az ultravékony metszeteken ezután immuncitokémiai reakciókat végeztünk (100). Az immunjelölés céljából a grideken lévő metszeteket Petri-csészébe helyeztük, és PBS-ben inkubáltuk 37°C-on, 30 percig, hogy eltávolítsuk a metszeteken maradt metilcellulóz/cukor keverékét, valamint a zselatint. Mindezek után a mintákat mostuk és blokkoltuk (3 x 2 perc) 20 mM glicines-PBS-el és 1%-os marha szérum albuminnal (BSA) 5 percig. A blokkolást követően a metszeteket 1 órán keresztül (szobahőmérsékleten) inkubáltuk nyúlban termeltetett poliklonális anti-GM-CSFR  $\beta$  antitesttel (1%-os BSA-PBS-ben) a megadott koncentrációban (**2. táblázat**). Ezt követően a mintákat mostuk, majd újra 0,1%-os BSA-PBS oldattal inkubáltuk (5 x 2 perc). A poliklonális GM-CSFR  $\beta$  kimutatására a metszeteket 10 nm-es kolloidális arannyal konjugált protein A-val (PAG10) inkubáltuk 30 percen át, szobahőmérsékleten, 1%-os BSA-PBS-ben oldva. A kolloidális arannyal történő jelölés után a grideket PBS-ben mostuk (5 x 2 perc), majd 1%-os glutáraldehiddel (5 perc) a metszeteket utófixáltuk. Mivel minden esetben kettős jelölést alkalmaztunk ezek után a mosás folyamatától kezdve ugyanazokat a lépéseket ismételtük meg. Tekintettel arra, hogy a GM-CSFR  $\beta$  citoplazmatikus lokalizációjára voltunk kíváncsiak, ezért mintáinkban második ellenanyagként korai (EEA1, korai endoszóma antigén-1), illetve késői endoszóma markerrel (Rab7, Ras rokon fehérje) kolokalizáltattuk a receptor  $\beta$  alegységet. Három napos gyulladt hashártyából készült metszeteket második antitestként EEA1-gyel, nyolc napos gyulladt mesenteriumból származó metszeteket pedig Rab7-tel inkubáltuk egy órán keresztül, szobahőmérsékleten az adott koncentrációkban (**2. táblázat**), 1%-os BSA-PBS-ben hígítva. A szükséges mosások után az EEA1-et és a Rab7-et 15 nm-es kolloidális arannyal konjugált protein A (PAG15) használatával (30 perc, szobahőmérsékleten) tettük láthatóvá (1% -os BSA-PBS-ben hígítva). Az inkubációs idő lejárta után desztillált vizes mosás következett, majd a gyors mosások után a metszeteket először 2%-os uranil-acetátban (pH: 7,0, 5 perc, jégen, sötétben), ezt követően pedig frissen készített 1,8%-os metilcellulóz és

0,4%-os uranil-acetát (pH: 4,0) elegyében inkubáltuk 5 percig (jégen, sötétben). Ezt követően a grideket műanyag kacsokon hagytuk száradni körülbelül 30 percig. Az elkészült metszeteket Hitachi H-7600-as (Tokió, Japán) transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a felvételeket pedig Adobe Photoshop 7.1 szoftver alkalmazásával dolgoztuk fel.

#### **4.7. Konfokális mikroszkópia**

##### *4.7.1. A minta fixálása, beágyazása konfokális immuncitokémiai vizsgálatokhoz*

Mintáinkat 4%-os PFA-ban fixáltuk egy órán át szobahőmérsékleten, majd 1%-os PFA-ban a felhasználásig tároltuk (4°C-on). Az immunfluoreszcens jelölésekhez a hashártya preparátumok beágyazását és metszését módosított Tokuyashu-technikával (101) végeztük. A fixált mintákat PBS-el (3 x 10 perc), majd a zsírtalanítás után glicines-PBS-el (1,26%-os) átmostuk (15 perc), és 10%-os zselatinban 30 percre termosztátba (37°C-ra) tettük. A zselatinnal átítatott mintákat ezt követően 10 percre jégre tettük, és a megdermedt, zselatinba ágyazott mintákból kb. 3 x 3 mm-es, apró blokkokat formáltunk. A mintákat minden esetben úgy orientáltuk, hogy a metszés során hosszanti metszési síkban tudtuk analizálni a hashártyákat. Krioprotekció céljából az elkészült blokkjainkat legalább egy éjszakára 2,3 M-os cukoroldatban, 4°C-on inkubáltuk, amelyeket végül alumínium pinekre tapasztattunk ki, és folyékony nitrogénben fagyasztottunk le. A lefagyasztott zselatinos blokkokból Leica fagyasztó ultramikrotóm (Bécs, Ausztria) segítségével 0,6 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A tárgylemezre helyezett metszeteken ezután egyes és kettős jelöléses immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk.

##### *4.7.2. Az immunjelölések menete és kiértékelése*

A fixálószer eltávolítása céljából félvékony metszeteinket PBS-sel (3 x 5 perc), és glicines-PBS-sel (15 perc) mostuk, majd az aspecifikus kötődések kivédésére 1%-os BSA-PBS-sel blokkoltuk (15 perc). Ezután a metszeteket a megfelelő primer ellenanyagokkal, a megfelelő hígításban (**2. táblázat**) inkubáltuk egy éjszakán át, 4°C-on. A következő napon a PBS-el való mosás (3 x 5 perc) után a megfelelő, fajspecifikus Alexa Fluor IgG fluoreszcens festékekkel konjugált ellenanyaggal (Alexa Fluor 488)



inkubáltunk 1 órán át, sötétben, láthatóvá téve ezzel a primer antitesteket. Amennyiben kettős jelöléses immunfestést végeztünk, annak érdekében, hogy elkerüljük a keresztkötések kialakulását a primer és a szekunder antitestek között, a metszeteket minden esetben újra mostuk glicines-PBS-sel, majd blokkoltuk 1%-os BSA-PBS-sel 15-20 percig. A blokkolás folyamata után az előbb említett lépéseket ismételtük a megfelelő szekunder antitestek, és az azokra specifikus Alexa festékek (Alexa Fluor 555) használatával (**2. táblázat**). A sejtmagok megfestéséhez Vectashield DAPI-t (2,4 diamidino-2-fenilindol) használtunk. Az immunjelölések végen 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 formáztuk.

#### **4.8. Statisztikai analízis**

Az immuncitokémiai vizsgálatainkat statisztikai mérésekkel támasztottuk alá, kizárva annak a lehetőségét, hogy a kolokalizáció mögött esetlegesen csak egymást fedő, „overlapping” jelintenzitások vannak. A kapott konfokális képeken - amelyek több független kísérletből készültek - minden egyes vizsgálati csoportban 12 mesothel sejtet elemeztünk ZEN program segítségével. Az elemzett sejtek mindegyikénél kritérium volt, hogy a teljes sejt látható legyen a képen, valamint a sejtmagja is benne legyen a metszési síkban. A ZEN programban található kolokalizációs menü segítségével meghatároztuk, hogy a különböző markerek kolokalizálnak-e egymással, vagy sem. A program meghatározta a Pearson-féle korrelációs koefficiens, amely információt nyújtott a zöld és piros csatornák intenzitási eloszlásáról az úgynevezett kolokalizációs régióban (3-as szóródási régió), és megmutatta, hogy a pontokra illesztett regressziós vonal mennyire reprezentálja az adatokat. Ha a pontok az egyenesre illeszkedtek, akkor a kolokalizáció magasnak tekinthető, ha pedig nagyon szórtak, akkor nem mutatható ki korreláció a két vizsgált marker között. A kapott korrelációs együtthatók adatait ezután leíró statisztikával elemeztük Microsoft Excel 2013 program segítségével. Az összes eredményt átlag  $\pm$  szórás (SD) értéként adtuk meg.

#### 4.9. Biokémiai vizsgálatok

##### 4.9.1. Mesothel sejtlizátum, citoplazma és magfrakció izolálása

Az izolált mesenteriumok biokémiai vizsgálatához Hjelle és munkatársai által leírt protokollt használtunk (102). A kontroll és a Freund adjuváns injektált állatok hasüregét 3-5 ml PBS-sel átmostuk, majd az izolált hashártyákat 0,2%-os kollagenázban (type II, DMEM/F12-ben oldva; Sigma-Aldrich®, Saint Louis, Missouri, USA) inkubáltuk egy órán át termosztátban, 37°C-on. A kollagenázos emésztés után a kötőszövetből, fehér zsírszövetből megszabadulva nyertük ki a hashártya mesothel sejtjeit. Ezután a mintákat centrifugálás közbeiktatásával (1000 rpm, 3 x 10 perc, 4°C) hideg PBS-ben mostuk. A pelleteket ezután műanyag Eppendorf csövekbe gyűjtöttük, 30 percig alumínium csónakokon folyékony nitrogén tetején hűtöttük, majd a felhasználásig -80°C-on tároltuk. A biokémiai vizsgálatokat megelőzően az izolált mesothel lizátumokat homogenizáló segítségével, lízis pufferben tártuk fel, amely 50 mM TRIS-HCl; pH: 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 200 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 1 mM NaF; 1%-os Nonidet P-40 és proteáz inhibitor (Complete Mini, Roche, Mannheim, Németország) keverékét tartalmazta. Ezeket a mintákat 60 percig jégen tartottuk, majd a nem oldódó komponenseket centrifugálással (12000 rpm, 20 percig, 4°C) távolítottuk el. A felülúszót (mesothel sejtlizátum) összegyűjtöttük, fehérjetartalmát a BCA-módszer segítségével (103) meghatároztuk, és a mintákat 2 mg/ml koncentrációra hígítottuk.

A mesothel sejtek citoplazma, illetve sejtmag frakciójának izolálásához a Thermo-Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA) által közzétett metodikát alkalmaztuk. A mesothel sejtek lizátumát először 1000 rpm-el (10 perc, 4°C), majd 2000 rpm-el (2x, 4°C) centrifugáltuk, az összegyűjtött sejteket előre lehűtött Eppendorf csövekbe helyeztük, majd felszuszpendáltuk 500 µl hipotóniás pufferrel, jégen 15 percen át (ismételgetve a szuszpendálást). Ezt követően a mintákhoz 25 µl detergenst (10% Nonidet P-40) adtunk, 10-20 másodperc vortexes keverés után az oldatot lecentrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc, 4°C). A centrifugálást követően 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) felszuszpendáltuk, 30 percig jégen inkubáltuk, közben 10 percenként vortexeltük. Ezt követően a mintákat 14000 g-vel lecentrifugáltuk (30

perc, 4°C). A felülúszót (sejtmagfrakció) Eppendorf csövekben összegyűjtöttük, és további feldolgozásig -80°C-on tároltunk. A két frakció fehérjetartalmát a BCA módszer (103) segítségével határoztuk meg, majd a mintákat 2 mg/ml koncentrációra hígítottuk.

#### 4.9.2. Western blot vizsgálat menete

Az egységes fehérje koncentrációkra hozott mesothel sejtlizátumok, sejtmag frakciók és citoplazma frakciók mintáihoz Tris-SDS puffert (0,5 M Tris pH: 6,8; 10% glicerol; 2% SDS; 0,00125% brómfenol kék; 0,5% merkaptotanol) adtunk - 1:1 arányú keveréket alkotva ezzel -, és 4 percen át forraltuk. A következő lépésben mintáink fehérjeit elektroforézis útján 10%-os poliakrilamid gélen elválasztottuk, amely során a gélt futtató pufferbe (0,3% TRIS, 1,44% glicin, 0,1% SDS UTV-ben) helyeztük, és a mintákat 200 V-on 30-40 percig futattuk. Ez után a gélt és a nitrocellulóz membránt (Amersham Hybond ECL, Németország) blot puffert (800 ml 0,38% TRIS és 1,8% glicin tartalmú UTV, 200 ml metanol) tartalmazó kádba helyeztük 15 percre. A fehérjék nitrocellulóz membránra való transzferjéhez a különválasztott fehérjéket tartalmazó gélt és a membránt blot pufferben, folyamatos hűtés mellett 1 órán át 100 V-on blottoltuk. A blottolást követően a nitrocellulóz membránokat 0,0005%-os Tween (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missouri, USA) -PBS pufferben mostuk (10 perc), majd a fehérjefrakciók pillanatnyi láthatóvá tétele miatt a membránt Ponceau S (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Saint Louis, Missouri, USA) oldattal kezeltük. Ezután a membránokat blokkolás céljából egy éjszakán át, 4°C-on, 5%-os, sovány tejpórral (Cell Signaling Technology<sup>®</sup>, Danvers, Massachusetts, USA) elegyített PBS-Tween oldatban inkubáltuk. Másnap a PBS-Tween pufferrel való mosás után a nitrocellulóz membránokat a primer antitestekkel (**2. táblázat**) 0,5%-os BSA-PBS-Tween detergensben hígítva egy éjszakán át, 4°C-on inkubáltuk. Töltési kontrollként  $\beta$ -tubulin és  $\beta$ -aktin antitesteket alkalmaztunk. Másnap a kötelező mosásokat követően a primer ellenanyagok láthatóvá tételéhez a membránokat specifikus, peroxidáz-konjugált, PBS-Tween-ben hígított szekunder antitestekkel (ECL Peroxidase-labelled anti-mouse/rabbit/goat antibodies, Amersham, GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, USA) 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubáltuk. A jelölt-fehérjék detektálásához a membránt kemolumineszcens oldattal

(Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore, USA) kezeltük, majd az immunreakciót röntgenfilm, illetve LI-COR C-Digit Blot scanner segítségével detektáltuk.

A membránokat mindezek után újbóli felhasználás céljából maximum 1 alkalommal sztrippeltük (ReBlot Plus: enyhe antitest eltávolító oldat; Merck Millipore Ltd, Dundee, Nagy-Britannia), majd újrablokkoltuk, és újabb próbát végeztünk el rajtuk. A kapott Western blot adatok kiértékeléséhez a relatív denzitásokat 3 független mérés eredményéből ImageJ program (U.S. National Institutional of Health, Bethesda, Maryland, USA) segítségével határoztuk meg, és Microsoft Excel 2013 programmal analizáltuk. A denzitometriai mérések esetében vagy a kontroll mintához képest mértük a vizsgált fehérjék relatív denzitását, vagy pedig a töltési kontrollnak használt  $\beta$ -tubulinhoz képest viszonyítva mértük a különböző fehérjék denzitását.

## 5. Eredmények

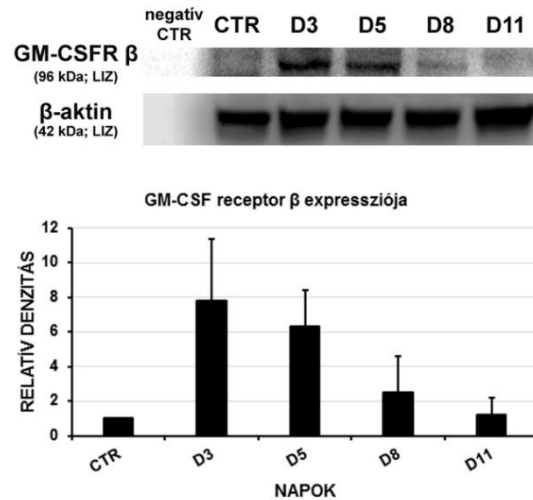
### 5.1. A GM-CSF receptor $\beta$ internalizációjának vizsgálata mesothel sejtekben

Korábbi eredményeink azt mutatták, hogy az EMT-hez vezető jelátviteli folyamatok beindulásához a receptor-ligand dinamin-függő internalizációja szükséges. Munkánk elsődleges célja ezért a GM-CSF receptor internalizációs útvonalának pontos feltérképezése volt. Vizsgálataink során a caveolák közreműködésével zajló endocitózisra fókuszáltunk, tekintettel arra, hogy a mesothel sejtek plazmamembránján csak kis számban figyelhetők meg clathrin-burkos struktúrák, a membrán-asszociált vezikulák többsége caveola.

A GM-CSF receptor  $\beta$  internalizációját fagyasztott fél- és ultravékony metszeteken kettős jelöléses immuncitokémiai módszerrel követtük nyomon. A kolokalizációs vizsgálatokhoz a receptor aktiválásáért, és az intracelluláris jelátviteli folyamatok indukálásáért felelős GM-CSF receptor  $\beta$  (104) alegysége ellen termeltetett ellenanyagot, és különböző endocitotikus markereket használtunk. Az endocitózis útvonalában szereplő sejtorganellumokat a rájuk jellemző markerekkel detektáltuk. A caveolákra jellegzetes caveolin-1, a korai endoszómák membránjában jelenlévő EEA1, a késői endoszómák membránjában kulcsfontosságú Rab7, és a reciklizáló endoszómákra jellemző Rab11a jelöléseket alkalmaztunk. A GM-CSF receptor  $\beta$  és az említett endocitotikus markerek kolokalizációs kapcsolatát az EMT és a MET különböző időpontjaiban vizsgáltuk.

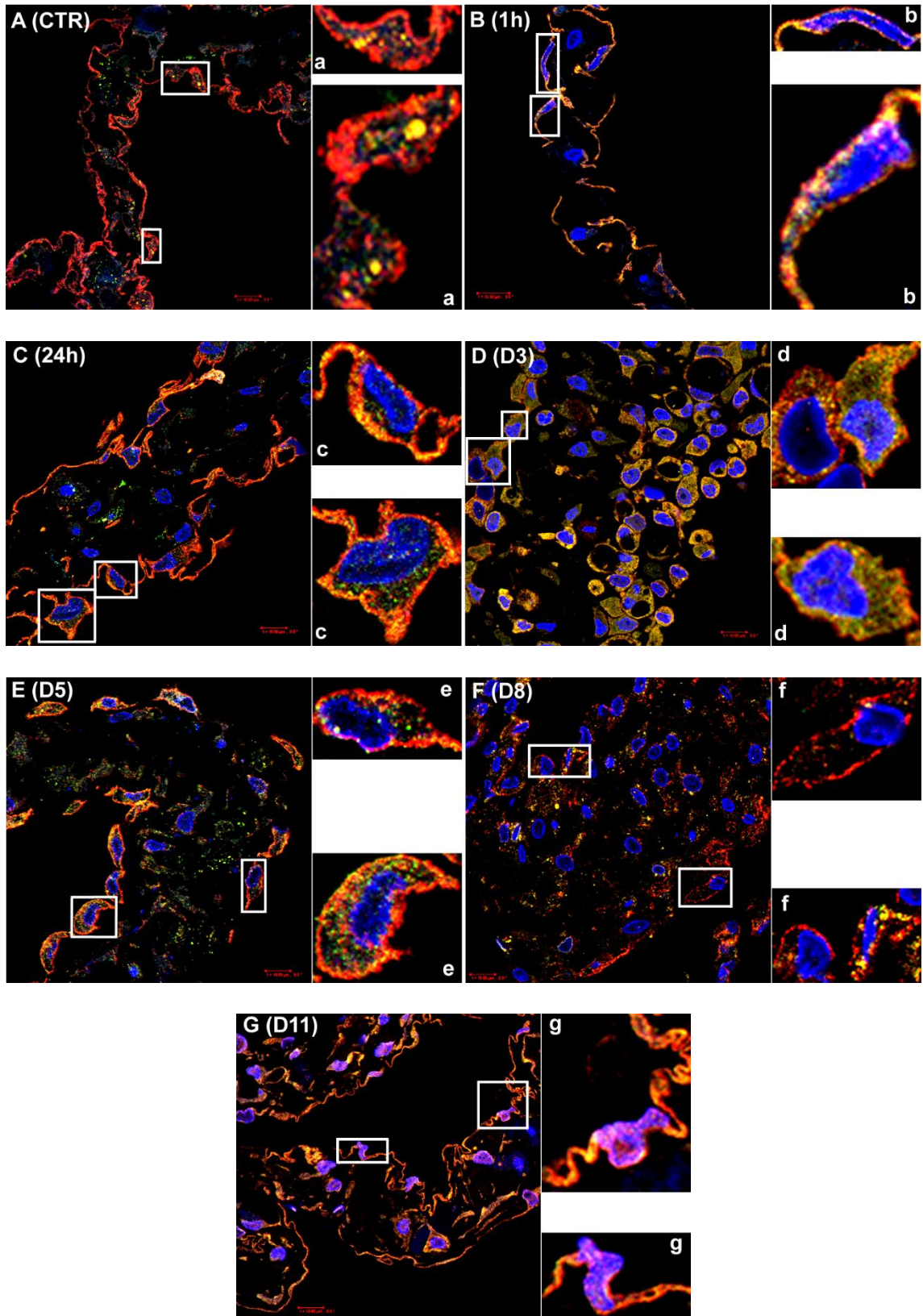
#### 5.1.1. A GM-CSFR $\beta$ expressziója és internalizációja: a caveolin-mediált endocitózis vizsgálata *in vivo* és *in vitro* rendszerben

Kontroll mesothel sejtekben GM-CSF receptor  $\beta$  csak csekély mennyiségben expresszálódik. A Freund adjuváns kezelést követő 3. napon a receptor expressziója jelentősen megnő, és eléri maximumát. A gyulladás 5. napján a mesothel sejtek még mindig jelentős mennyiségben expresszálják a GM-CSFR  $\beta$ -t, a 8. napon azonban, a gyulladás beindulásával a receptor expressziós szintje drasztikusan csökken. Western blot vizsgálataink eredménye azt mutatja, a regeneráció végére (11. nap) a receptor már csak alig detektálható mennyiségben van jelen a mesothel sejtekben (**16. ábra**).



**16. ábra.** A GM-CSFR  $\beta$  expresszióját mutató Western blot és a hozzá tartozó denzitometria eredménye, kontroll és kezelt mesothel sejtek lizátumában (LIZ). Töltési kontrollnak  $\beta$ -aktint használtunk. A relatív denzitást háromszor ismételt mérés eredményéből számítottuk.

Immuncitokémiai felvételeinken jól látható, hogy kontroll sejtekben (*in vivo*), a kis mennyiségben expresszáldó  $\beta$  alegység egy része caveolin-1 pozitív vezikulákban van jelen (**17. ábra/A**). 1 órás *in vitro* GM-CSF kezelést követően a GM-CSFR  $\beta$  és a caveolin-1 között látványosan megnő a kolokalizáció; a még lapos, elnyúlt sejtek citoplazmájában jóval több sárga színű, kettős-jelölt caveola figyelhető meg (**17. ábra/B**). 24 órás kezelés után (*in vitro*) a két marker kolokalizációja még mindig jelentősnek mondható, de már detektálhatunk önálló, csak receptort tartalmazó (zöld szín) struktúrákat is a sejtek citoplazmájában (**17. ábra/C**). A Freund adjuváns kezelést követő 3. napon (*in vivo*), - amikor a legnagyobb mennyiségben expresszáldó receptor - receptort tartalmazó, kettősen jelölt; és csak caveolin-1 pozitív vezikulákat is azonosíthatunk a kerekded mesothel sejtekben (**17. ábra/D**). Az 5. napon (*in vivo*) a két jel kezd különválni egymástól. A caveolin-1 expresszió piros kontúrvonalként jelenik meg a mesothel sejtek plazmamembránja mentén, amíg a receptor  $\beta$  többsége már önálló, zöld pontokként azonosítható a citoplazmában (**17. ábra/E**). A regeneráció beindulásával (8. nap, *in vivo*) a kisebb mennyiségben jelenlévő  $\beta$  alegység és a caveolin-1 között alig detektálható kolokalizáció (**17. ábra/F**). A 11. napon (*in vivo*) csekély mennyiségben expresszáldó receptor  $\beta$  újra jelentős kolokalizációt mutat az apró, caveolin-1 pozitív caveolákkal (**17. ábra/G**).



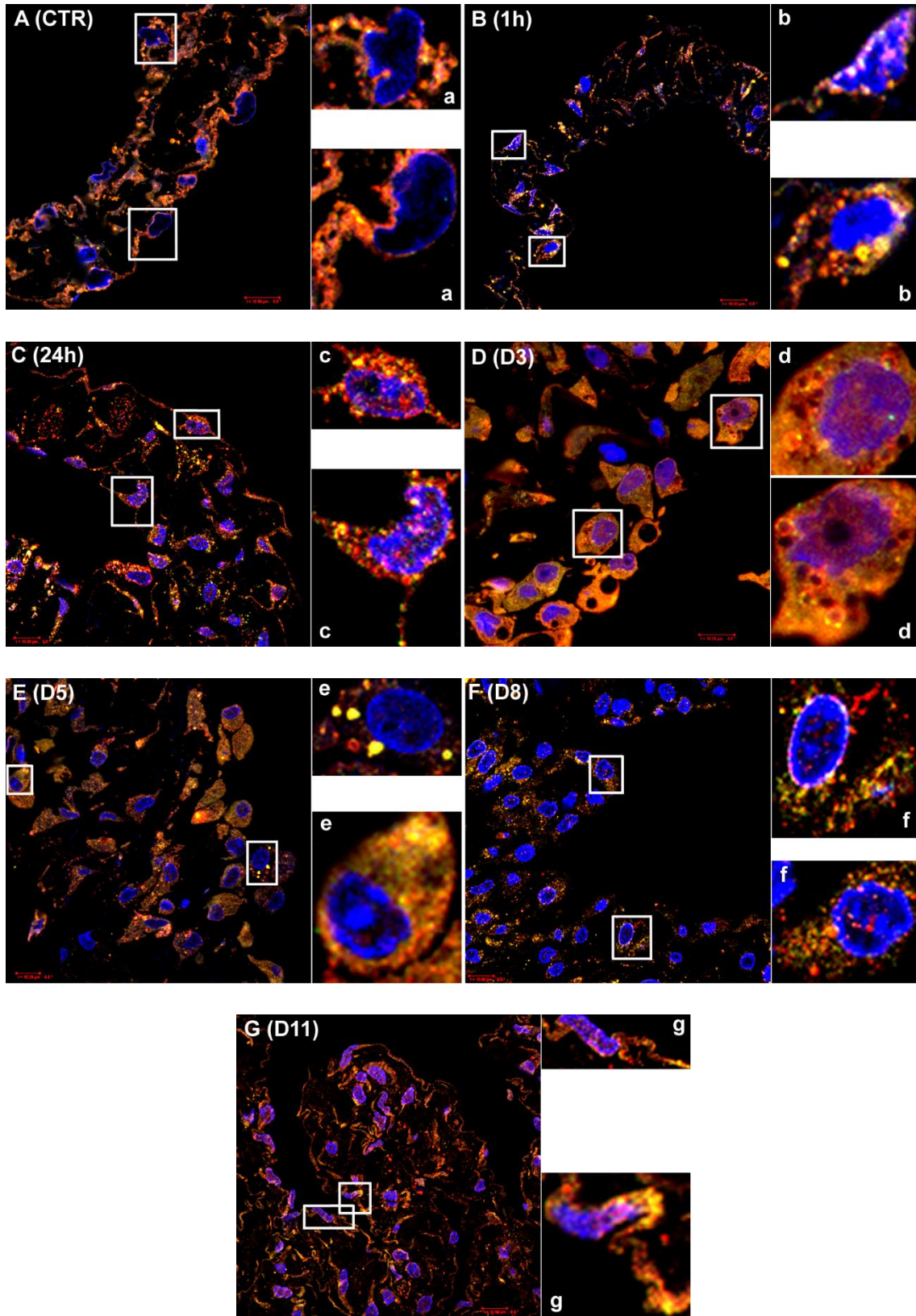
**17. ábra. GM-CSFR  $\beta$  a caveolákban (*in vivo*, *in vitro*). (A/a):** Kontroll sejtekben (*in vivo*) is detektálható néhány receptor-pozitív (sárga) caveola. (A kötőszövetben számos receptor  $\beta$ -t expresszáló sejt figyelhető meg). **(B/b, C/c):** 1 és 24 órás GM-CSF kezelés (*in vitro*) után a  $\beta$  receptor és a caveolin-1 között nő a kolokalizáció. **(D/d):** A gyulladás 3. napján (*in vivo*) receptor-pozitív (narancssárgás), és receptor-negatív (piros) caveolák egyaránt megfigyelhetők. **(E/e, F/f):** Az 5. és 8. napon (*in vivo*) a caveolin-1 piros kontúrvonalat rajzol a mesothel sejtek felszínén, a receptor pedig különálló, zöld jelet ad. **(G/g):** A 11. napon (*in vivo*) a receptorok zöme ismét caveolákban van jelen. (Kék: DAPI; zöld: GM-CSFR  $\beta$ ; piros: caveolin-1). Bar~10,80  $\mu\text{m}$ .

### 5.1.2. Az internalizált GM-CSF receptor $\beta$ útja a korai endoszómák felé

A korai endoszómák az endocitotikus útvonal fontos állomásai, találkozási pontot nyújtanak a sejtek által felvett szignál molekulák és intracelluláris partnereik számára, befolyásolni tudják a jelátviteli folyamatok lehetséges kimeneteleit (105). A kérdés az volt, hogy a caveolák közreműködésével felvett GM-CSFR  $\beta$  bekerül-e a korai endoszómákba a mi rendszerünkben. Ennek vizsgálatára kettős jelöléses immunfestést végeztünk anti-GM-CSFR  $\beta$  és anti-EEA1 antitestekkel. Az EEA1, Rab5 effektor fehérjeként a korai endoszóma membránjának citoplazmatikus felszínén lokalizálódik (106), éppen ezért egy igen gyakran használt korai endoszómális marker.

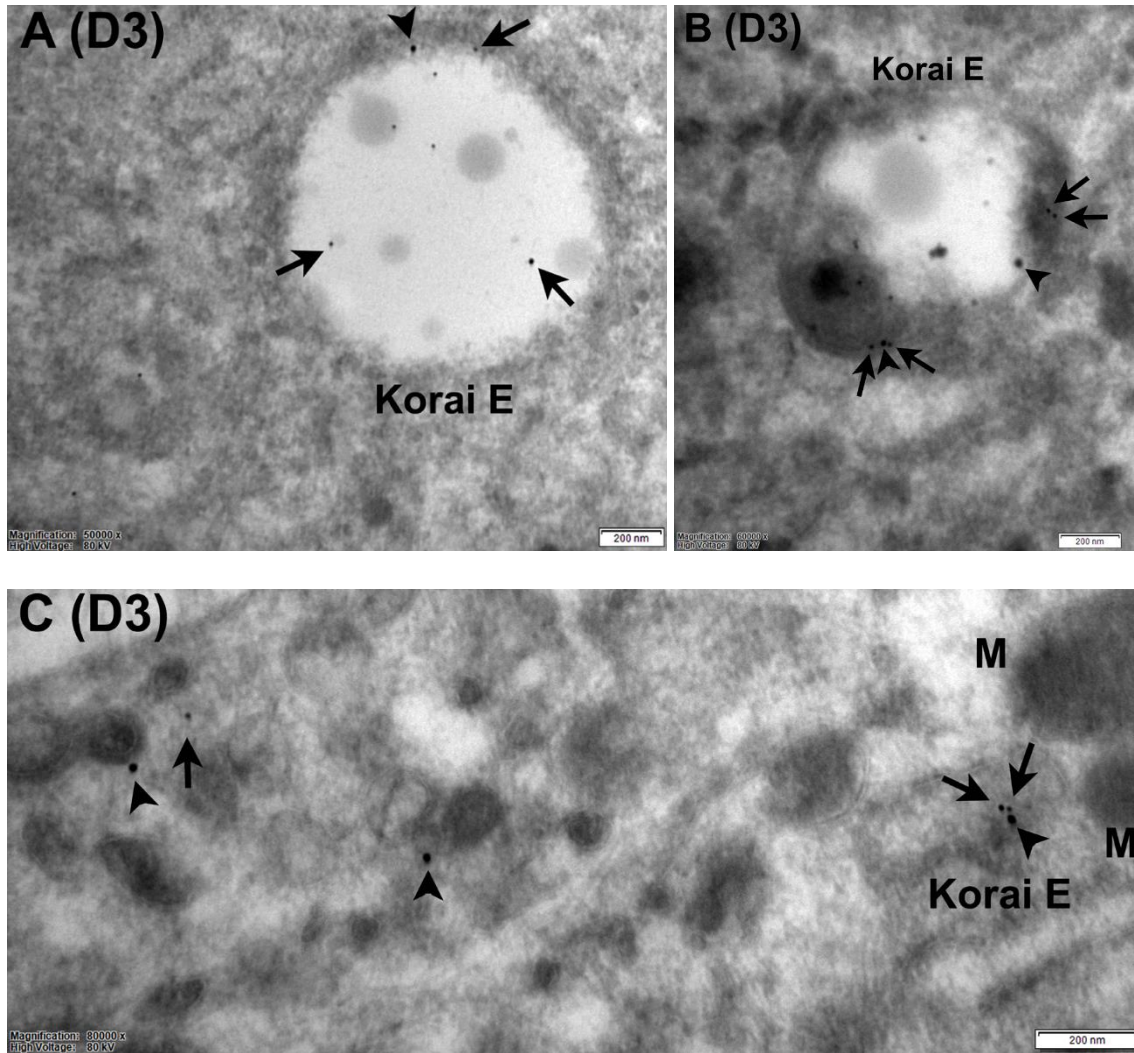
A konfokális felvételeken jól látható, hogy már a kontroll sejtekben (*in vivo*) is van GM-CSFR  $\beta$ -át tartalmazó EEA1-pozitív sejtalkotó **(18. ábra/A)**, és a GM-CSF kezelés után 1 órával (*in vitro*) ez a kolokalizáció tovább erősödik **(18. ábra/B)**. A 24 órás kezelést követően (*in vitro*) is sok receptor-pozitív (sárga) endoszóma azonosítható, de számuk kevesebb, mint a receptorral nem jelölt (piros) endoszómáké **(18. ábra/C)**. A gyulladás 3. napján (*in vivo*) a mesothel sejtek citoplazmájában számos kettős-jelölt korai endoszómát figyelhetünk meg. Az EEA1-jelölt korai endoszómák membránjában (piros karikák) az internalizált GM-CSFR  $\beta$  alegységek zöld pontokként azonosíthatóak **(18. ábra/D)**. Az 5. napon (*in vivo*) receptor-pozitív (sárga) és receptor-negatív (piros) endoszómák is detektálhatók, jelezvén, hogy a receptor részben már kikerült a korai endoszómákból; a 8. napon (*in vivo*) - néhány kettős-jelölt endoszómától eltekintve - a kolokalizáció elenyészővé válik, a két marker külön-külön azonosítható **(18. ábra/E, F)**. A 11. napon (*in vivo*) a kis mennyiségben expresszálódó GM-CSFR  $\beta$  újra jelentős kolokalizációt mutat a korai endoszómák markerével **(18. ábra/G)**.





**18. ábra. GM-CSF receptor  $\beta$  az EEA1-pozitív korai endoszómákban (*in vivo*, *in vitro*).** (A/a): Kontroll mesothel sejtekben (*in vivo*) sok apró, receptor-pozitív (sárga) korai endoszóma figyelhető meg. (B/b, C/c): 1 órás (*in vitro*) GM-CSF kezelést követően a két marker nagyon intenzív kolokalizációt mutat, számos apró, kettős-jelölt (sárga) korai endoszóma figyelhető meg ekkor a sejtekben, majd 24 óra után ez az intenzititás gyengül. (D/d): A gyulladás 3. napján (*in vivo*) a két marker kolokalizációja igen látványos, számos EEA1-jelölt (piros karikaként azonosítható) korai endoszóma membrájában detektálható egyedi GM-CSF receptor  $\beta$  jel. (E/e): Az 5. napon (*in vivo*) receptorról is jelölt, és receptort nem tartalmazó endoszómákat is megfigyelhetünk a citoplazmában. (F/f): A regeneráció beindulásával (8. nap, *in vivo*) a két jel szinte teljesen különvlik, csak néhány kettős-jelölt korai endoszóma detektálható. (G/g): A 11. napon (*in vivo*), a regenerálódott mesothel sejtekben újra jelentős kolokalizációt mutat a receptor és az EEA1. (Kék: DAPI; zöld: GM-CSFR  $\beta$ ; piros: EEA1). Bar~10,80  $\mu$ m.

Konfokális eredményeinket elektronmikroszkópos immunjelölés útján is igyekeztünk megerősíteni, amely során a Freund adjuváns injekcióját követő 3. napon kinyert mesenterium minták (*in vivo*) fagyasztott, ultravékony metszetein végeztünk immuncitokémiai vizsgálatokat. Elektronmikroszkópos felvételeinken jól látható, hogy a gyulladás 3. napján számos, GM-CSF receptor  $\beta$  alegységet tartalmazó (10 nm-es kolloidális Au), korai endoszómát (15 nm-es kolloidális Au) sikerült azonosítani a mesothel sejtek citoplazmájában. Sok esetben megfigyelhető, hogy a két marker néhány nanométeres távolságban van egymástól (19. ábra/A-C).

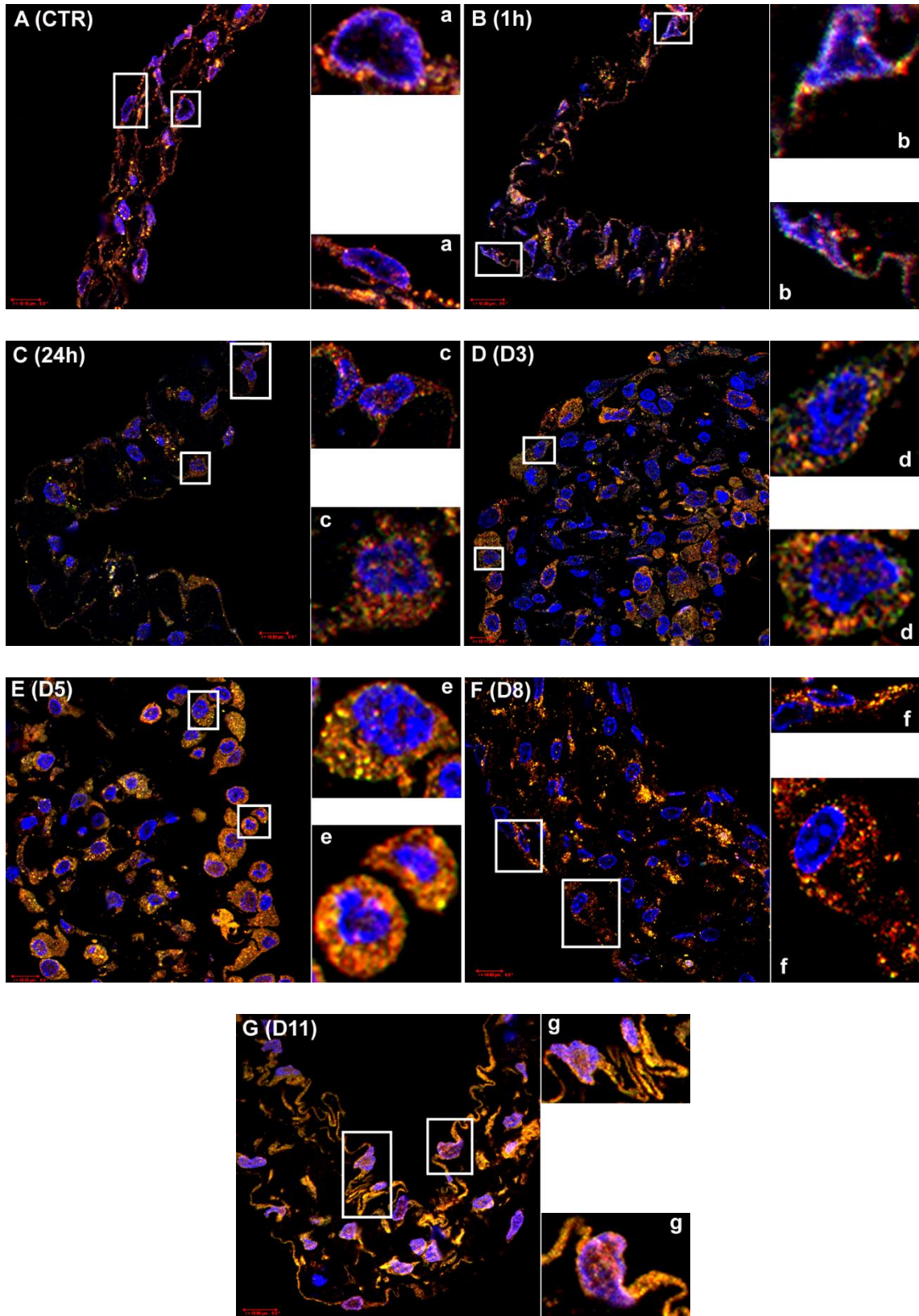


**19. ábra. GM-CSF receptor  $\beta$  a korai endoszómákban: fagyasztott ultravékony metszetekről készült elektronmikroszkópos felvételek. (A-C):** A Freund adjuvánsal indukált gyulladás 3. napján (*in vivo*), a mesothel sejtekben a GM-CSFR  $\beta$  (10 nm-es kolloidális Au) zömében az EEA1-pozitív (15 nm-es kolloidális Au) korai endoszómákban van jelen. (Teljes nyíl: GM-CSFR  $\beta$ ; nyíl fej: EEA1; E: endoszóma; M: mitokondrium). Bar=200 nm.

### 5.1.3. A GM-CSF receptor $\beta$ további sorsa: reciklizáció vagy lebontás?

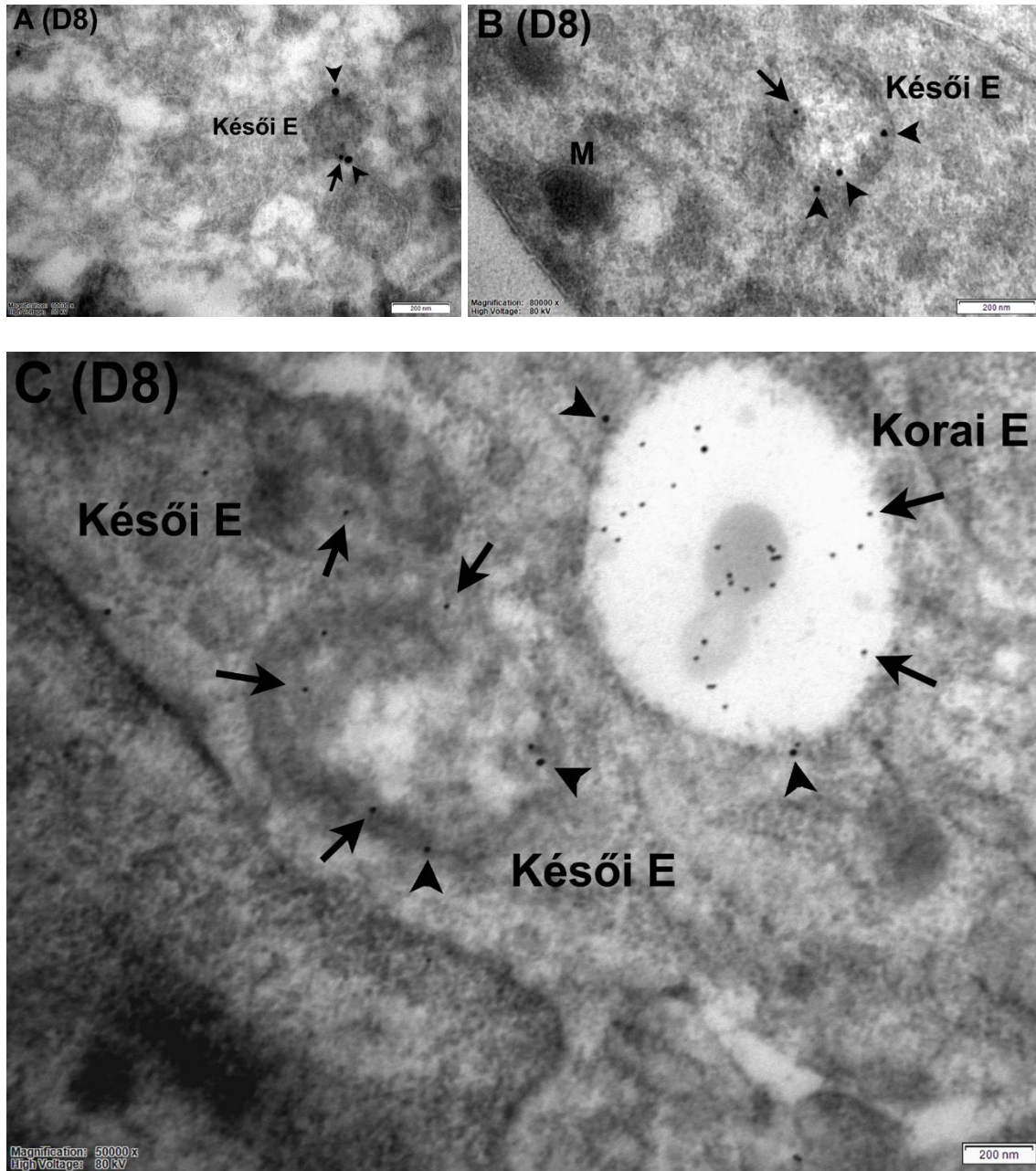
Az endocitózissal felvett cargo útja a korai endoszómákból leggyakrabban a reciklizáló vagy a késői endoszómák felé vezet. A reciklizáló endoszómákba szállított anyagok - gyakran receptorok - visszakerülve a sejt felszínére részt vehetnek egy újabb endocitotikus ciklusban, míg a késői endoszómákba jutott cargo lizoszómális degradáció révén lebontásra kerül a (107). Annak megválaszolására tehát, hogy a GM-CSF receptor  $\beta$  a korai endoszómákból reciklizáló, vagy késői endoszómába kerül-e, kolokalizációs vizsgálatokat végeztünk a késői (Rab7) és a reciklizáló (Rab11a) endoszómák jellegzetes markereivel.

A Rab7 markerrel végzett immuncitokémiai vizsgálatok során azt találtuk, hogy a kontroll sejtekben (*in vivo*), kis mennyiségben expresszált GM-CSF receptor  $\beta$  elég jelentős kolokalizációt mutat már ekkor a késői endoszómákkal, számos receptor-pozitív sejtalkotót figyelhetünk meg a vékony citoplazma nyúlványokban (**20. ábra/A**). Az 1 és 24 órás *in vitro* GM-CSF kezelést követően azonban a kettős-jelölt endoszómák száma jelentősen csökken (**20. ábra/B, C**). Habár a gyulladás 3. napján (*in vivo*) nagyobb számban figyelhetünk meg kettősen jelölt, receptor- és a Rab7-pozitív sejtalkotókat, a két marker többnyire külön-külön detektálható (**20. ábra/D**). A gyulladás előrehaladtával, az 5. napra (*in vivo*) egyre több receptor-pozitív multivezikuláris test jelenik meg a mesothel sejtekben (**20. ábra/E**). A 8. napon (*in vivo*), a gyulladás lecsengésével és a gyógyulás kezdetével a két marker kolokalizációja nagyon erős. A Rab7-jelölt organelumok mindegyike receptor-pozitív, egyedüli receptor jelet szinte nem is tudunk azonosítani a sejtek citoplazmájában (**20. ábra/F**). A regeneráció végén (11. nap, *in vivo*) a két marker kolokalizációja fennmarad (**20. ábra/G**).



**20. ábra. GM-CSF receptor  $\beta$  a Rab7-pozitív késői endoszómákban (*in vivo*, *in vitro*).** (A/a): Habár a kontroll sejtekben (*in vivo*) csak kevés GM-CSFR  $\beta$  expresszálódik, citoplazmájukban találunk receptor-pozitív (sárga) és receptor-negatív (piros) késői endoszómákat is. (B/b, C/c): *In vitro*, 1 és 24 órás GM-CSF kezelés után a két marker különválik, csak néhány késői endoszóma mutat kettős-jelölést. (D/d): *In vivo*, 3 nappal a gyulladás indukálása után habár nő a receptort tartalmazó késői endoszómák száma a mesothel sejtek citoplazmájában, többségük csak Rab7-pozitív. (E/e): A gyulladás 5. napján (*in vivo*) a kettősen jelölt késői endoszómák száma szignifikánsan megnő. (F/f): A regeneráció kezdetével (8. nap, *in vivo*) számos kettős-jelölt multivezikuláris test azonosítható a mesothel sejtekben, csak GM-CSFR  $\beta$ -t tartalmazó struktúrák gyakorlatilag nincsenek. (G/g): A 11. napon (*in vivo*) a két marker kolokalizációja jelentős marad; sok apró, sárga színben feltűnő késői endoszóma detektálható a vékony citoplazma nyúlványokban. (Kék: DAPI; zöld: GM-CSFR  $\beta$ ; piros: Rab7). Bar~10,80  $\mu$ m.

Konfokális fénymikroszkópos vizsgálatainkat fagyasztott, ultravékony metszeteken elvégzett immuncitokémiai vizsgálataink is megerősítik. A Freund adjuváns kezelést követő 8. napon (*in vivo*) a mesothel sejtek citoplazmájában számos GM-CSF receptor  $\beta$  alegységet tartalmazó (10 nm-es kolloidális Au), és Rab7-tel jelölt (15 nm-es kolloidális Au) késői endoszóma azonosítható. Az a megfigyelés, hogy a késői endoszómák kevesebb receptor jelet tartalmaznak, mint a koraiak jelzi, hogy a késői endoszómákba került receptor  $\beta$  alegységek zöme nagy valószínűséggel már degradálódott. Fontos megjegyezni, hogy az endoszóma érésének, a késői endoszóma kialakulásának nélkülözhetetlen lépése az úgynevezett Rab5-Rab7 „switch” (107). Ez lehet a magyarázata annak, hogy néhány esetben Rab7 jelölés detektálható a korai endoszómák membránján is (21. ábra/A-C).

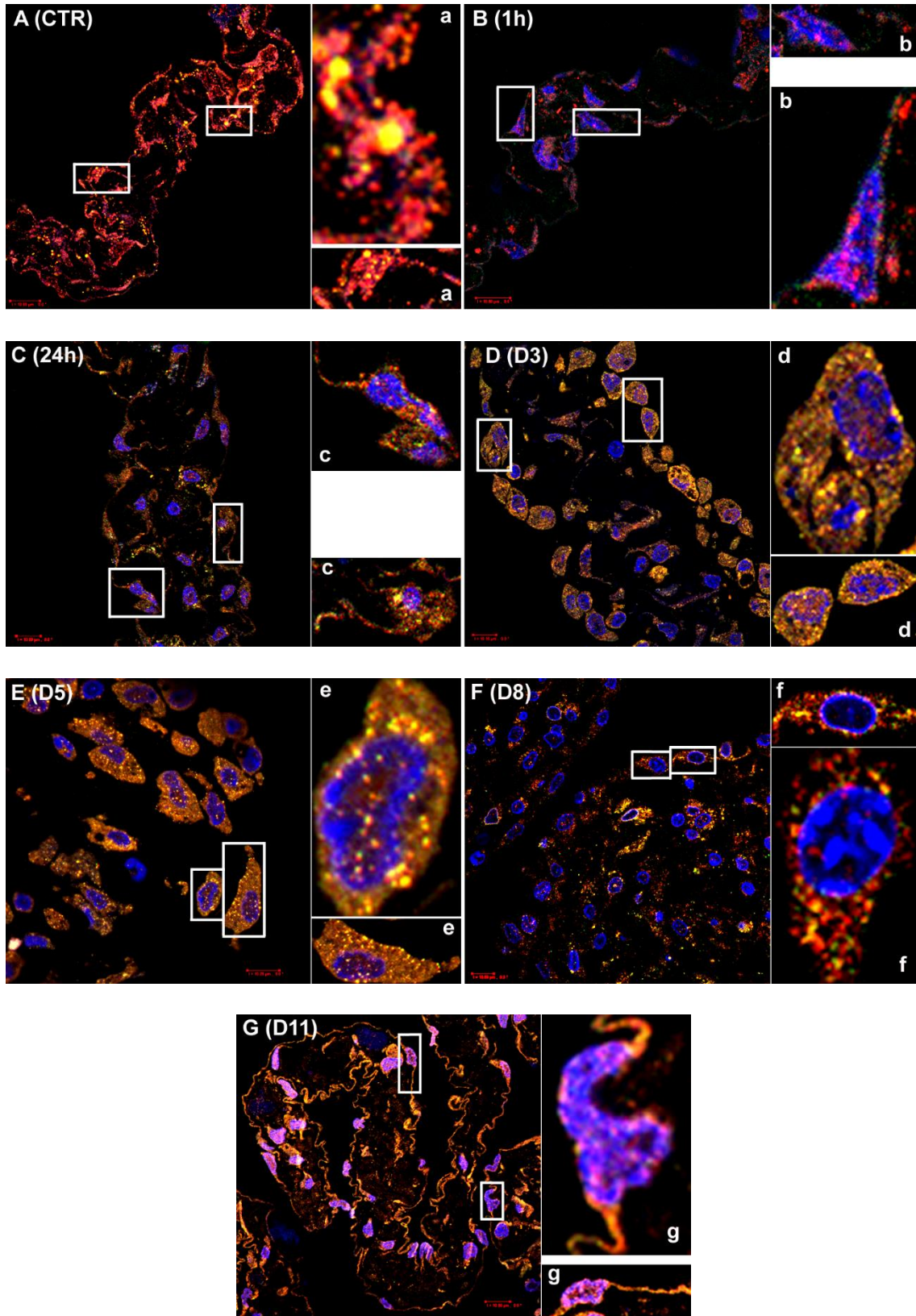


**21. ábra. GM-CSF receptor  $\beta$  a késői endoszómákban: elektronmikroszkópos immuncitokémia fagyasztott, ultravékony metszeteken. (A-C): A kis aranyzemcsékkal (10 nm) jelölt GM-CSF receptor  $\beta$  alegységek zömében Rab7-pozitív (15 nm-es kolloidális Au) késői endoszómákban detektálhatók. (Teljes nyíl: receptor  $\beta$ ; nyíl fej: Rab7; E: endoszóma). Bar=200 nm.**

A korai endoszómákból a felvett anyag gyors és lassú reciklizáció útján is visszajuthat a plazmamembránra. A lassú reciklizáció egyik fő regulátor molekulája a Rab11a fehérje (108). Munkánk során a továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a GM-CSF receptor  $\beta$  visszajut-e a plazmamembránra, azaz megjelenik-e a Rab11a-jelölt reciklizáló endoszómákban.

Immuncitokémiai vizsgálataink azt mutatják, hogy a kontroll mesothel sejtekben (*in vivo*) kettős-jelölt (sárga), és GM-CSFR  $\beta$ -t nem tartalmazó (piros), apró reciklizáló endoszómák is detektálhatók (**22. ábra/A**). Az 1 órás GM-CSF kezelést követően (*in vitro*) nem találunk kolokalizációt a két marker között (**22. ábra/B**), majd 24 óra elteltével újra azonosítható néhány receptor- és Rab11a-pozitív endoszóma az átalakuló félben lévő mesothel sejtek citoplazmájában (**22. ábra/C**). A gyulladás 3. napján (*in vivo*) jelentősen megnő a GM-CSF receptor  $\beta$  és Rab11a kettős-jelölt endoszómák mennyisége (**22. ábra/D**), és számuk fokozódik az 5. napig (*in vivo*), amikor szinte csak GM-CSFR  $\beta$  immunpozitív reciklizáló endoszómák figyelhetők meg a plazmamembránhoz közeli citoplazmában (**22. ábra/E**). Ezek az adatok egyértelműen arra utalnak, hogy amíg a gyulladás fennáll, a receptor visszajut a plazmamembránra. A gyógyulás beindulásával, a 8. napon (*in vivo*) a két marker leginkább csak külön-külön detektálható, habár találunk még egy-két kettős-jelölt reciklizáló endoszómát (**22. ábra/F**). A regeneráció végén, a 11. napon (*in vivo*) a GM-CSFR  $\beta$  és a Rab11a újra erős kolokalizációt mutat (**22. ábra/G**).





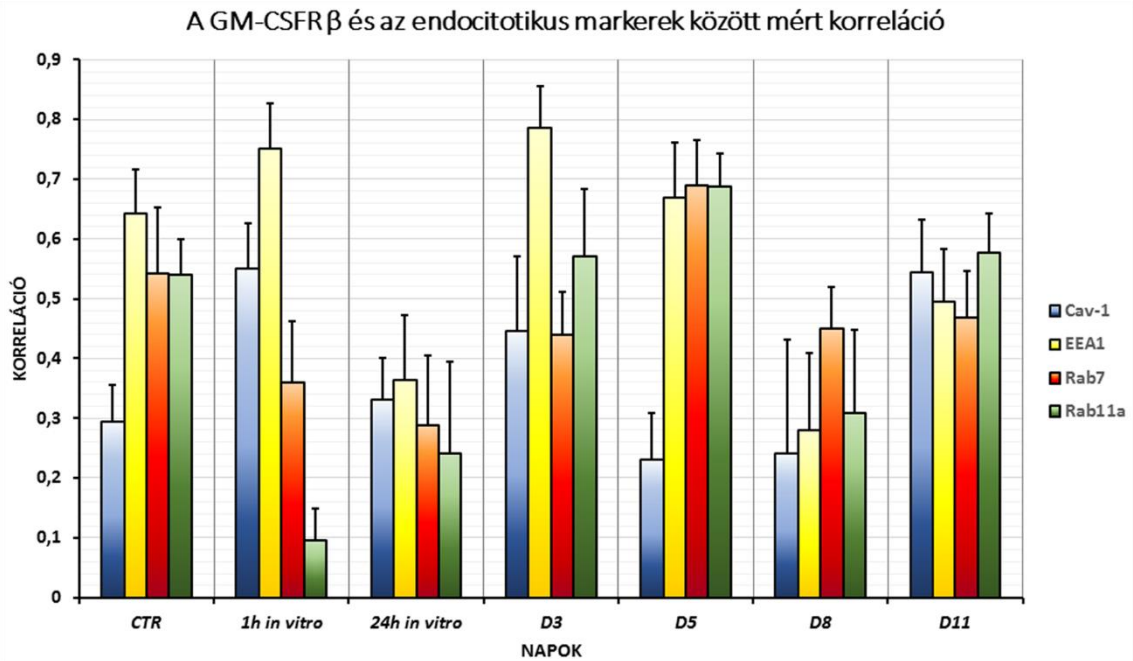
**22. ábra. GM-CSF receptor  $\beta$  a Rab11a-pozitív reciklizáló endoszómákban (*in vivo*, *in vitro*).** (A/a): Kontroll mesothel sejtekben (*in vivo*) megfigyelhetünk GM-CSFR  $\beta$  jelet tartalmazó (sárga), és nem tartalmazó (piros) reciklizáló endoszómákat is. (B/b, C/c): *In vitro*, 1 órás GM-CSF kezelés után nincs kolokalizáció a két marker között, a 24 órás kezelést követően azonban megjelenik néhány receptor-pozitív, kettős-jelölt reciklizáló endoszóma a sejtek citoplazmájában. (D/d): A gyulladás 3. napján (*in vivo*) a kettősen jelölt reciklizáló endoszómák száma jelentősen megnő. (E/e): A gyulladás csúcspontjában, az 5. napon (*in vivo*) még több GM-CSF receptor  $\beta$ -val is jelölt, kettős-pozitív endoszómát figyelhetünk meg a sejtekben. (F/f): A gyógyulás beindulásával (8. nap, *in vivo*) a reciklizáló endoszómák zöme szinte kizárólagosan Rab11a-jelölt, receptort csak kevés tartalmaz. (G/g): A 11. napon (*in vivo*) újra számos, kettős-jelölt vezikula látható a vékony citoplazma nyúlványokban. (Kék: DAPI; zöld: GM-CSFR  $\beta$ ; piros: Rab11a). Bar~10,80  $\mu$ m.

## 5.2. A GM-CSF receptor $\beta$ és az endocitotikus markerek kolokalizációjának kvantitatív vizsgálata

Immuncitokémiai vizsgálatainkat statisztikai mérésekkel támasztottuk alá. Ezen vizsgálatok segítségével kizárható, hogy a mikroszkópban detektált kolokalizációt az esetlegesen csak egymást fedő, „overlapping” jelintenzitások eredményezik.

A GM-CSFR  $\beta$  és az adott markerek korrelációja alapján elmondhatjuk, hogy habár a kontroll sejtek (*in vivo*) csak kis mennyiségben expresszálják a receptort, annak zöme már ekkor részt vesz egy endocitotikus ciklusban, caveolákban is detektálható, és az endocitózis különböző sejtorganellumainak jellegzetes markereivel is jelentős korrelációt mutat. Az *in vitro* indukált EMT korai időpontjaiban (1 és 24 óra GM-CSF kezelés) a GM-CSFR  $\beta$  és a korai endoszómális marker közötti kolokalizáció a legmagasabb, jelezvén, hogy a caveolák közreműködésével internalizált GM-CSFR  $\beta$  alegységek - akár percek alatt is - bekerülnek a korai endoszómákba, biztosítva ezzel az EMT-hez szükséges jelátviteli folyamatok fenntartását. A Freund adjuváns injektálását követő 3. napon (*in vivo*) a GM-CSFR  $\beta$  és az EEA1 között mért korreláció kimagasló, habár a reciklizáló endoszómákat jelölő Rab11a is jelentős kolokalizációt mutat a receptorral. A gyulladás előrehaladtával a GM-CSFR  $\beta$  és a Rab7, késői endoszómális marker között is erősödő korrelációt láthatunk, amely maximumát az 5. napon (*in vivo*) éri el. Megjegyzendő, hogy ezen a napon a GM-CSF receptor  $\beta$  az összes endocitotikus sejtorganellum (kivéve caveolák) markerével jelentős kolokalizációt mutat. A

regeneráció beindulásával, a 8. napon (*in vivo*) még mindig a GM-CSFR  $\beta$  és a Rab7 közötti korreláció a legmagasabb. A 11. napon (*in vivo*) mért magas kolokalizáció arra utal, hogy a gyógyult mesothel sejtekben, a kis mennyiségben expresszált GM-CSF receptor  $\beta$  nagy valószínűséggel újra internalizálódik, és újabb endocitotikus ciklusban vesz részt (23. ábra).



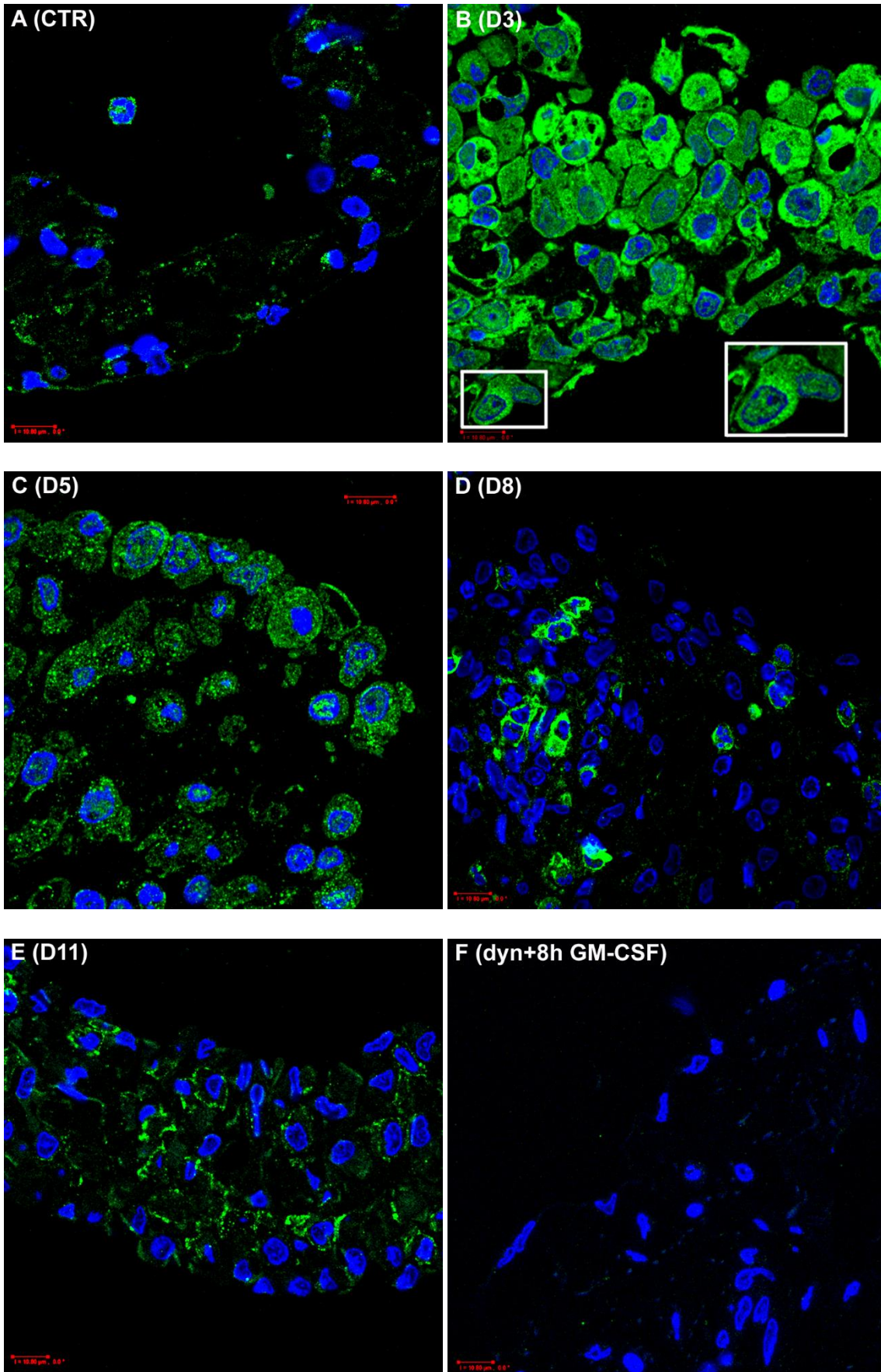
**23. ábra. A GM-CSF receptor  $\beta$  és endocitotikus markerek kolokalizációjának statisztikai elemzése.** Kontroll mesothel sejtekben (*in vivo*) a GM-CSFR  $\beta$  és a caveolin-1 között diszkrét kolokalizáció mérhető, amely jelentősen megnő az 1 órás *in vitro* kezelés után. A kontroll (*in vivo*), valamint az *in vitro* kezelt mintákban is a legmagasabb kolokalizáció a korai endoszómális markerrel mérhető. *In vivo*, a gyulladás 3. napján a receptor és az endocitotikus markerek közötti korreláció erősödik, de továbbra is a korai endoszómákban detektálható a legnagyobb mennyiségben a GM-CSFR  $\beta$ . A következő napokban, ahogy a gyulladás eléri csúcspontját, a receptor lokalizációs maximuma a korai endoszómákból a reciklizáló, majd a késői endoszómák felé tolódik el. Az 5. napon (*in vivo*) jelentősen nő a Rab11a marker és a receptor között mért kolokalizáció, de a legmagasabb értéket Rab7-tel éri el. A 8. napon (*in vivo*) még mindig a késői endoszómális markerrel detektálható a legjelentősebb kolokalizációja a receptornak. A 11. napon (*in vivo*), a diagrammon látható magas értékek azt mutatják, hogy a kis mennyiségben expresszáldó receptor újra jelentős mértékben kolokalizál a különböző endocitotikus markerekkel, jelezvén, hogy egy újabb internalizációs ciklusban vesz részt.

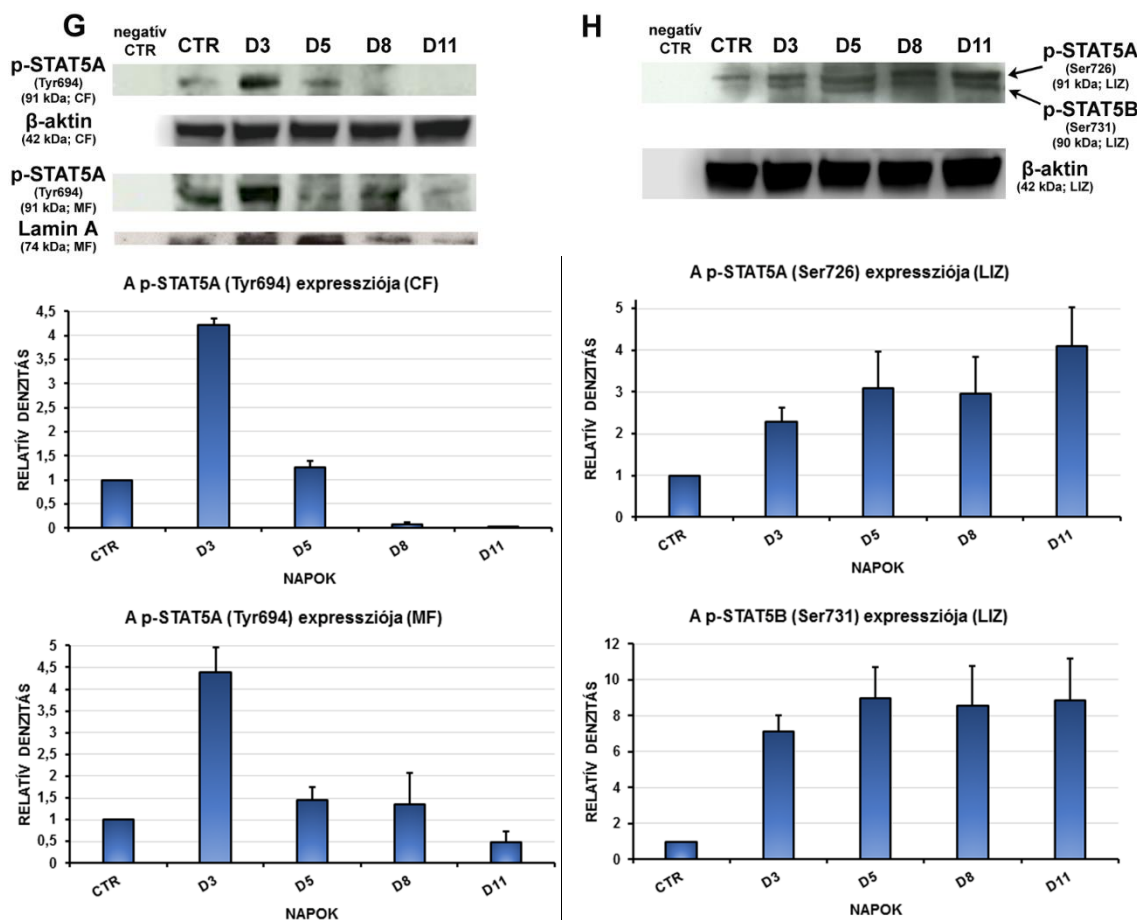
### 5.3. Jelátvitel az EMT és a MET során: a STAT5 aktiválódása

A GM-CSF jelátvitel egyik legfontosabb downstream eleme a STAT5. Tirozinon történő foszforilációja nélkülözhetetlen transzkripció aktivitásához, de szerinen is foszforilálható, amely szintén szükséges működéséhez (109). Annak vizsgálatára, hogy a mi rendszerünkben a GM-CSF elindítja-e jelátviteli mechanizmusát, immunocitokémiai és Western blot analízisekkel követtük nyomon a tirozinon és szerinen foszforilált STAT5 faktorok expressziós szintjének változásait, valamint a tirozinon foszforilált forma citoplazmatikus eloszlását.

Az aktivált, tirozinon foszforilált STAT5A (p-STAT5A) kis mennyiségben már kontroll mesothel sejtekben is kimutatható **(24. ábra/A, G)**. A gyulladás 3. napján a hashártya minden sejtjében nagyon erős citoplazmatikus és nukleáris p-STAT5A immunjelölés detektálható **(24. ábra/B)**. Biokémiai eredményeink is azt mutatják, hogy a gyulladás hatására (3. nap) a kontrollhoz képest jelentősen megnő a p-STAT5A expressziós szintje a mesothel sejtek citoplazma és sejtmag frakciójában is **(24. ábra/G)**. A gyulladás 5. napján ugyan még mindig detektálható p-STAT5A jel a kerekded sejtekben **(24. ábra/C)**, de expressziója láthatóan csökken **(24. ábra/G)**. A 8. és 11. napon a mesothel sejtek citoplazmájában p-STAT5A expresszió szinte alig azonosítható, azonban a mesothel sejtek magfrakciójában, és a hashártya kötőszöveti sejtjeiben, egy kis mennyiségben még kimutatható **(24. ábra/D, E, G)**. Annak igazolására, hogy a GM-CSF receptor  $\beta$  internalizációja elengedhetetlen feltétele a downstream jelátviteli folyamatoknak, így a STAT5 aktiválódásának is, vizsgáltuk a tirozinon foszforilált STAT5A expresszióját *in vitro*, dynasor-ral és GM-CSF-fel kezelt primer hashártya tenyészetben. Eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy ha gátoljuk a GM-CSF receptor internalizációját (dynasore kezeléssel), a mesothel sejtekben a STAT5A tirozinon való foszforilációja nem következik be **(24. ábra/F)**, jelezvén, hogy az internalizáció gátlásával a downstream jelátviteli útvonalat is gátoltuk.

A szerinen foszforilált STAT5 izoformák biokémiai vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy kontroll sejtekben a szerinen foszforilált p-STAT5B nem detektálható, ezzel szemben a STAT5A foszforilált formája már ekkor expresszálódik. A Freund adjuváns kezelést követően a p-STAT5B expressziós szintje megnő, és a p-STAT5A szintjéhez hasonlóan, fokozódik a regeneráció végéig **(24. ábra/H)**.





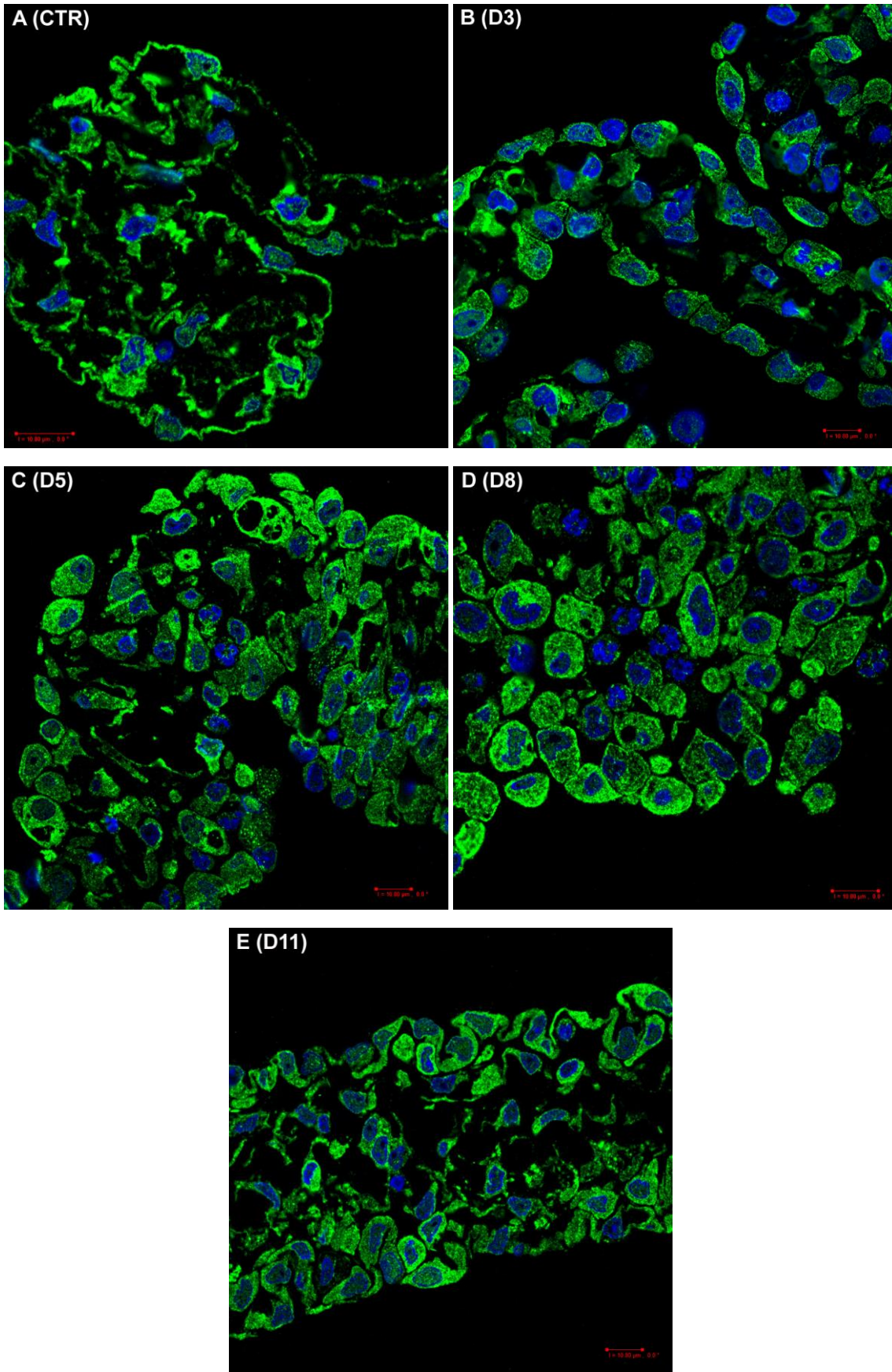
**24. ábra. Az aktivált, p-STAT5 faktorok expressziójának változása a GM-CSF jelátvitel során. (A):** Kontroll mesothel sejtekben csak kis mennyiségben expresszálódik a STAT5A 694-es tirozinján foszforilált formája. **(B):** A gyulladás 3. napján a mesothel sejtekben és a kötőszövet sejtjeiben is nagy mennyiségben detektálható p-STAT5A mind a citoplazmában mind pedig a sejtmagban (lásd kinagyított sejt a fehér boxban). **(C):** Az 5. napon a p-STAT5A jel csökken, és pontszerű eloszlásban figyelhető meg. **(D, E):** A 8. és a 11. napon a mesothel sejtekben p-STAT5A nem detektálható, a kötőszövet sejtjei azonban továbbra is p-STAT5A immunpozitivitást mutatnak. **(F):** A dynasore-ral és GM-CSF-fel kezelt mesothel sejtekben (*in vitro*) a p-STAT5A egyáltalán nem expresszálódik. **(G):** Western blot eredményeink azt mutatják, hogy a p-STAT5A expressziója a gyulladás 3. napján éri el maximumát a mesothel sejtek citoplazma- (CF) és a magfrakciójában (MF) is. Az 5. naptól expressziós szintje jelentősen csökken, és a következő napokban (8. és 11. nap) a citoplazmában nem is detektálható, a sejtmagban azonban jelen van a regeneráció végén is. **(H):** A 726-os szerinjen foszforilált STAT5A már a kontroll sejtek lizátumában (LIZ) is mérhető, és szintje jelentősen emelkedik a Freund adjuváns kezelést követően. A STAT5 B izoformája 731-es szerin aminosaván nem foszforilálódik kontroll sejtekben, a kezelt sejtekben azonban ezen foszforilált forma expressziója a p-STAT5A expressziójához hasonlóan változik. Töltési kontrollnak β-aktint és Lamin A-t használtunk. (Kék: DAPI; zöld: p-STAT5A (Tyr 694)). Bar~10,80 μm.

#### 5.4. A SOCS1 expressziós vizsgálata

A SOCS (suppressor of cytokine signaling) fehérjék családja a JAK-STAT útvonalon keresztül fellépő gyulladáscsökkentő citokinek által indukált jelátviteli mechanizmusok negatív visszacsatolást adó, gátló molekulái. A SOCS fehérjék mindegyikére igaz, hogy konzervált doménjeik révén több ponton is képesek modulálni a jelátviteli folyamatokat. Centrális SH2 doménjük révén gátolni tudják a downstream partnerek kötődését a tirozinon foszforilált kinázokhoz vagy citokin receptorokhoz, továbbá SOCS-boksz doménjük által katalizálják a jelátviteli molekulák ubiquitinilálását és lebontását. A SOCS1 - és a SOCS3 - azonban egyedülálló módon közvetlenül is blokkolni tudják a jelátvitelben szereplő kinázok működését kináz gátló doménjük (KIR domén) segítségével (110, 111).

Munkánk következő lépésében ezért jogosan tettük fel a kérdést, hogy jelen van-e ilyen regulátor molekula a mi rendszerünkben, és szerepet játszik-e a GM-CSF által EMT-t indukáló jelátviteli folyamatokban. Ennek érdekében a gyulladás és a regeneráció különböző időpontjaiban immuncitokémiai vizsgálatokkal követtük nyomon a JAK2-STAT5 jelátvitel egyik leghatékonyabb inhibitorának, a SOCS1-nek az expresszióját a mesothel sejtekben.

A konfokális felvételeken jól látható, hogy a SOCS1 expressziója végig jelentősnek mondható, már a kontroll hashártya mesothel és kötőszöveti sejteiben is erősen expresszálódik (**25. ábra/A**). A gyulladás 3. napján megfigyelhető, hogy jelintenzitása csökken, eloszlása egyenletes (**25. ábra/B**). A gyulladás előrehaladtával, az 5. napon a SOCS1 expressziója erősödik, de eloszlása még mindig egyenletes, diffúz (**25. ábra/C**). A regeneráció beindulásával (8. nap) azonban a nagy mennyiségben expresszálódó fehérje citoplazmatikus eloszlása megváltozik, és egyre több mesothel sejtben ad a plazmamembrán mentén határozott, marginális jelet, s mint egy gyöngysor szinte körberajzolja a mesothel sejteket (**25. ábra/D**). A gyógyulás végén, a 11. napon, a SOCS1 expressziója továbbra is jelentős, eloszlása azonban ismét diffúz képet mutat (**25. ábra/E**).





**25. ábra. A SOCS1 expressziója a kontroll és kezelt mesothel sejtekben. (A):** A SOCS1 már a kontroll mesothel sejtekben is nagy mennyiségben expresszálódik. **(B):** A gyulladás 3. napján a SOCS1 jelintenzitása csökken. **(C, D):** Az 5. és a 8. napon expressziója fokozódik, azonban a 8. napon kifejezettebb expressziót detektáltunk a sejtek plazmamembránja mentén. **(E):** A 11. napon, a regenerálódott mesothel sejtek még mindig jelentős mennyiségben expresszálják a SOCS1 fehérjét. (Kék: DAPI; zöld: SOCS1). Bar=10,80 µm.

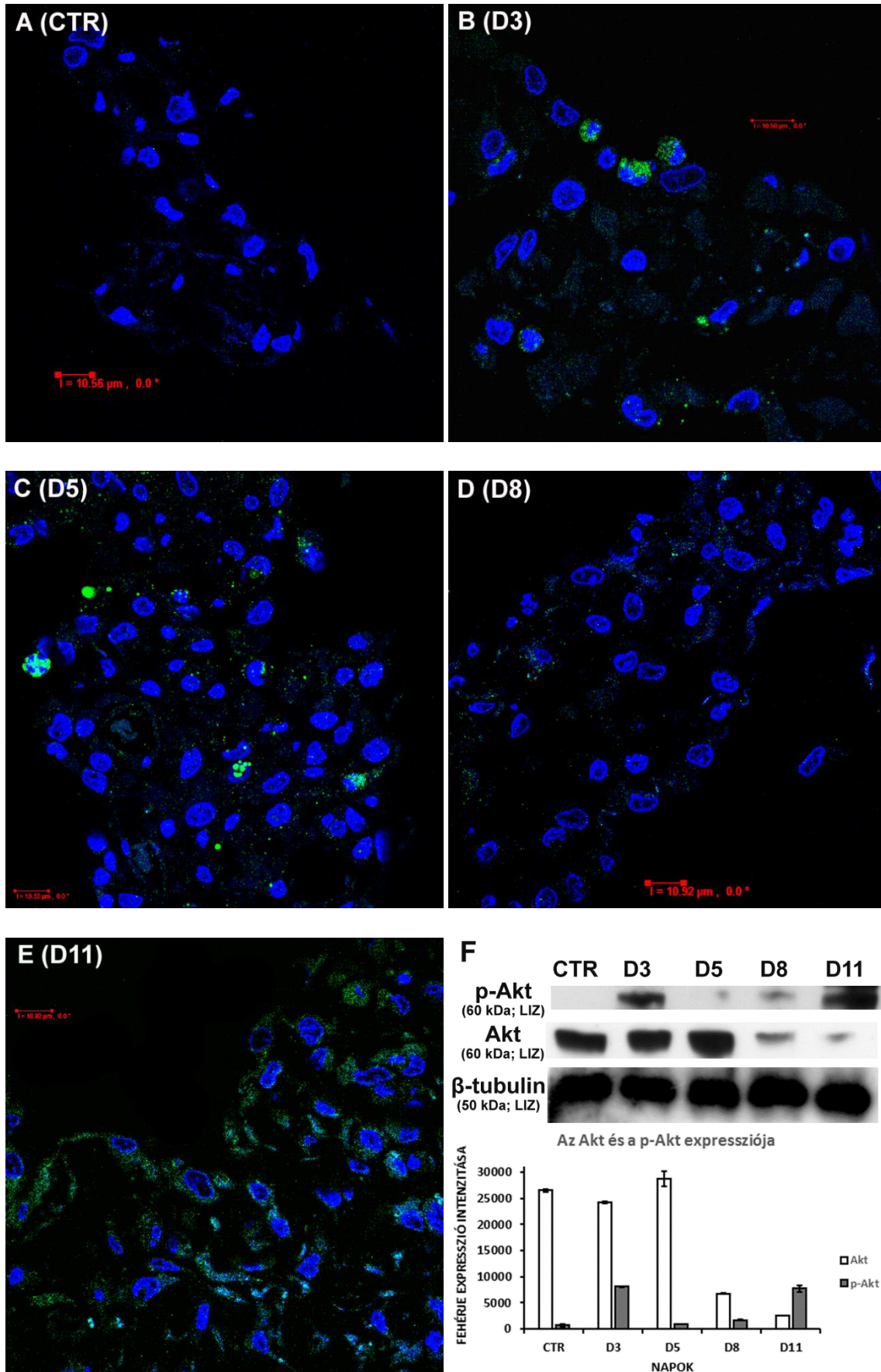
### 5.5. Az autofágia molekuláris háttere

Az autofágia folyamatát a gyulladás és a regeneráció során immuncitokémiai és biokémiai módszerekkel tanulmányoztuk. Vizsgálataink során az autofágia folyamatában közvetett (Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR, EEA1, Rab7) és közvetlen (Beclin-1, LC3) módon szerepet játszó markerek expresszióját vizsgáltuk meg.

#### 5.5.1. Az Akt aktivációja

Tekintettel arra, hogy az autofágia egyik fő szabályozó mechanizmusa az Akt-mTOR útvonal (112), vizsgálatainkat az Akt fehérje tanulmányozásával kezdtük. Nyomon követtük az inaktív, foszforilálatlan Akt; és a működőképes, aktív, foszforilált-Akt (p-Akt; Thr308) expressziós változásait.

Western blot eredményeink azt mutatják, hogy az Akt nem foszforilált, inaktív formájának expressziója a kontrollban és a 3 napos gyulladt mesothelben is magas, maximumát az 5. napon éri el, majd fokozatosan csökken (**26. ábra/F**). A foszforilált Akt (p-Akt) vizsgálata során azt találtuk, hogy kontroll mesothel sejtekben nem expresszálódik (**26. ábra/A, F**). A Freund adjuváns kezelést követő 3. napon azonban jelentősen megnő expressziója (**26. ábra/B, F**), majd az 5. és 8. napon drámaian lecsökken (**26. ábra/F**), s csak néhány mesothel sejtben detektálhatunk p-Akt jelet (**26. ábra/C, D**). A regeneráció végére, a 11. napon a p-Akt expressziója újra markánsan megemelkedik (**26. ábra/F**), és a gyógyult, laphám morfológiát mutató mesothel sejtek ismét p-Akt pozitívak (**26. ábra/E**). Denzitometriás eredményeink igazolják, hogy a nem foszforilált Akt expressziója rendkívül magas a gyulladás 5. napjáig, ezzel szemben az Akt foszforilációja csak a 3. és a 11. napon jelentős (**26. ábra/F**).



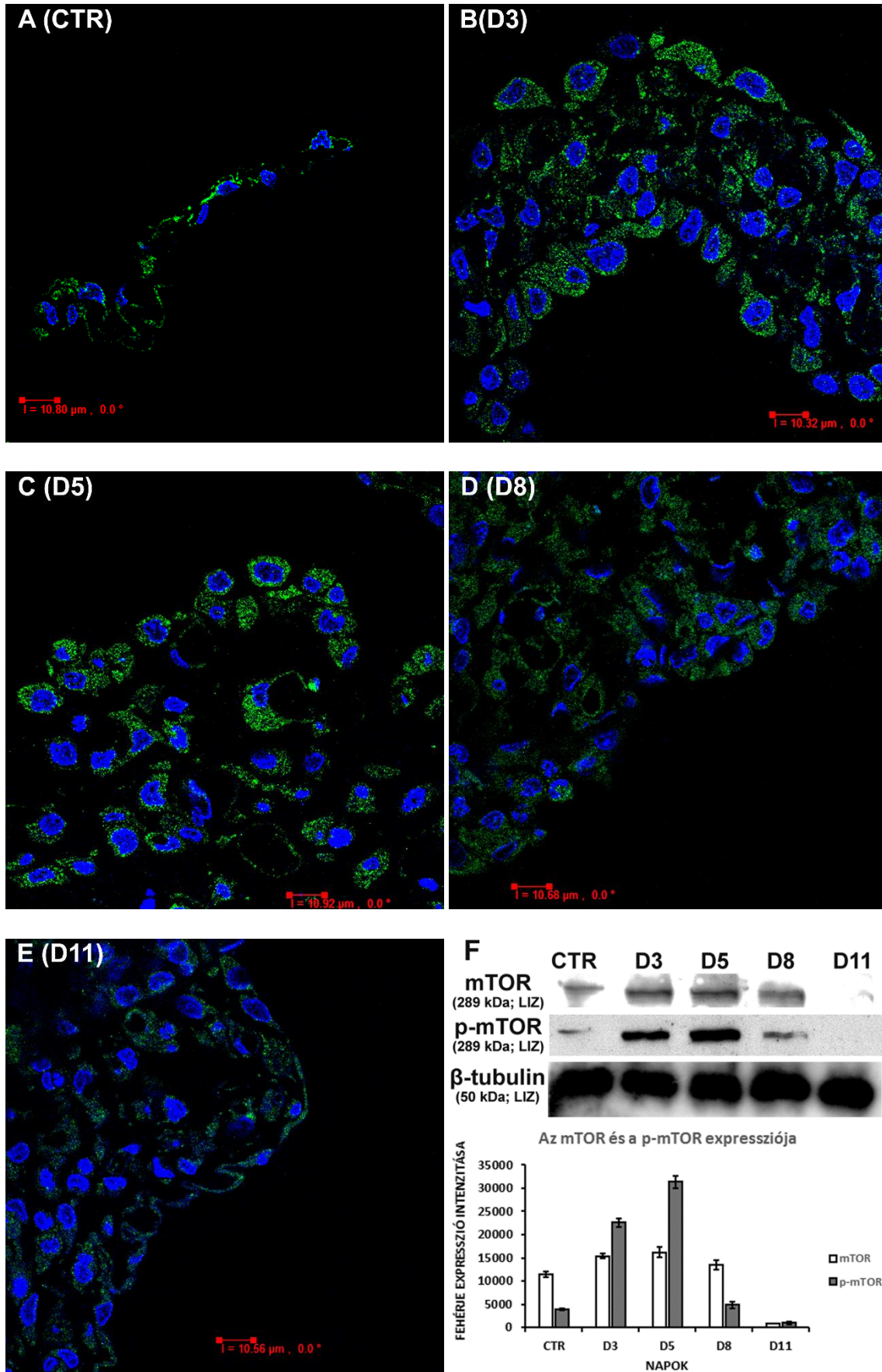
**26. ábra. Az Akt és p-Akt expressziójának vizsgálata kontroll és Freund adjuvánsal kezelt mesothel sejtekben.** Immuncitokémiai (A-E) és Western blot (F) eredmények. (A): Kontroll mesothelben p-Akt nem detektálható. (B): A gyulladás 3. napján nő a p-Akt immunpozitivitás. (C): Az 5. napon p-Akt jel szinte alig detektálható a mesothel sejtekben, a kötőszöveti sejtekben viszont erősen expresszálódik (lásd: graulocita a mesenterium bal oldalán). (D): A 8. napon, amikor az autofágia nagyon intenzív, a mesothel sejtekben p-Akt pozitívítás nem detektálható. (E): A 11. napon, a regenerálódott sejtekben újra jelentős p-Akt expresszió figyelhető meg. (F): A mesothel sejtek lizátumában (LIZ) a gyulladás kezdetén az inaktív Akt expressziója magas, a maximumot az 5. napon éri el; ezzel ellentétben p-Akt csak a 3. és a 11. napon expresszálódik a mesothel sejtekben. Az Akt/p-Akt expressziós intenzitásának grafikonja háromszor ismételt Western blot denzitometriájának átlagát és szórását mutatja. Töltési kontroll:  $\beta$ -tubulin. (Kék: DAPI; zöld: p-Akt). Bar~10  $\mu$ m.

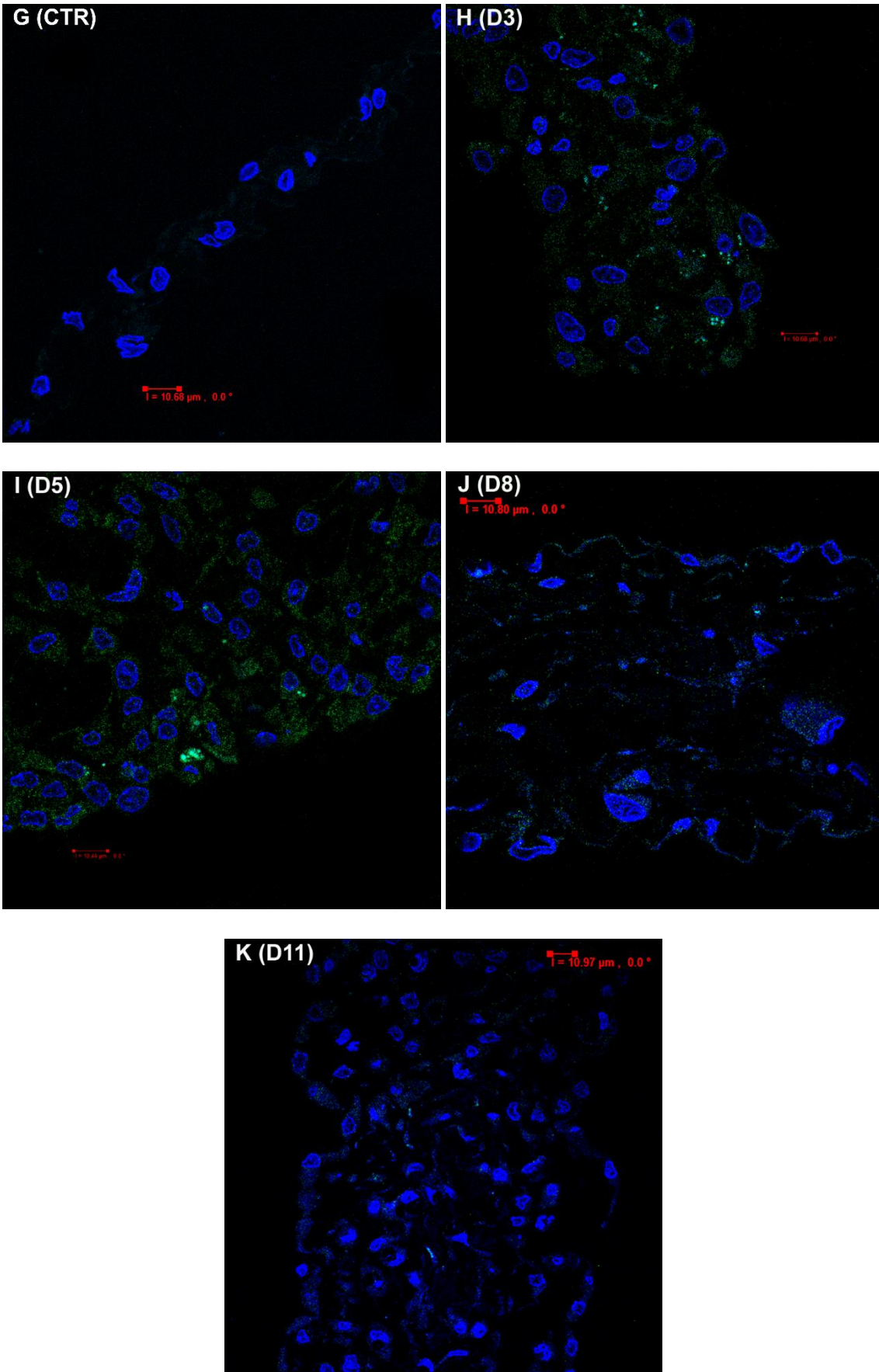
#### 5.5.2. Az mTOR aktivációja

Az autofágia szabályozásában rendkívül fontos szerepet játszik az mTOR. Aktív, foszforilált formája ugyanis az egyik fő gátló faktora az autofágiának (113).

Vizsgálataink során az aktív és inaktív mTOR formák expresszióját követve szignifikáns különbségeket tapasztaltunk. Kontroll mesothel sejtekben a nem foszforilált, inaktív mTOR kimutatható (27. ábra/A, F), expressziója tovább erősödik a kezelést követő 3. és 5. napon (27. ábra/B, C, F). A gyulladás lecsengésével, a kezdődő regeneráció során (8. nap) mennyisége fokozatosan csökken (27. ábra/D, E, F).

A jelátvitelben aktív formát jelentő foszforilált mTOR a kontroll mesothel sejtekben alig detektálható (27. ábra/F, G). A Freund adjuváns kezelés után 3 nappal azonban egyre erősödő p-mTOR expresszió tapasztalható (27. ábra/F), és specifikus, pontszerű eloszlásban figyelhető meg a differenciálódó mesothel sejtekben (27. ábra/H). A p-mTOR expressziója csúcspontját az 5. napon éri el (27. ábra/F, I). A regeneráció kezdetekor (8. nap) szintje jelentősen csökken (27. ábra/F), p-mTOR pozitív mesothel sejteket szinte nem is találunk a hashártyában (27. ábra/J). A 11. napon a p-mTOR expressziója tovább csökken (27. ábra/F), a gyógyult mesothel sejtekben nem detektálható (27. ábra/K). Az mTOR/p-mTOR intenzitási arányát összehasonlítva láthatjuk, hogy mindkettő emelkedő tendenciát mutat a gyulladás 5. napjáig, majd a p-mTOR expressziója drasztikusan lecsökken, míg az inaktív mTOR szintje a 8. napon is magas marad (27. ábra/F).





**27. ábra. Az mTOR és p-mTOR expressziós változása a gyulladás és a regeneráció alatt.** Konfokális mikroszkóppal készült felvételek az mTOR (**A-E**), és p-mTOR (**G-K**) expressziójáról, valamint biokémiai vizsgálatok mesothel sejtek lizátumában (LIZ) (**F**). (**A**): Kontroll mesothelben az inaktív mTOR komplex kimutatható. (**B, C**): A Freund adjuváns kezelést követő 3. és 5. napon az mTOR jelintenzitása fokozatosan erősödik. (**D, E**): A 8. napon az mTOR jel csökken, majd a 11. napra jelentősen gyengül. (**G**): Kontroll sejtekben p-mTOR szignál nem detektálható. (**H**): A gyulladás 3. napján specifikus p-mTOR immunpozitív struktúrák figyelhetők meg. (**I**): A p-mTOR jel erőssége az 5. napon a legmarkánsabb. (**J, K**): A 8. napon a p-mTOR jelölés szinte teljesen eltűnik a mesothel sejtekből, a 11. napon már nem is detektálható. (**F**): Western blot eredményeink alátámasztják immunocitokémiai adatainkat. Az mTOR/p-mTOR intenzitását mutató grafikon három immunblot denzitometriájának átlagát és szórását reprezentálja. Töltési kontroll:  $\beta$ -tubulin. (Kék: DAPI; zöld: mTOR, p-mTOR). Bar~10  $\mu$ m.

### 5.5.3. Az autofágia közvetlen szereplői: a Beclin-1 és az LC3B expressziója

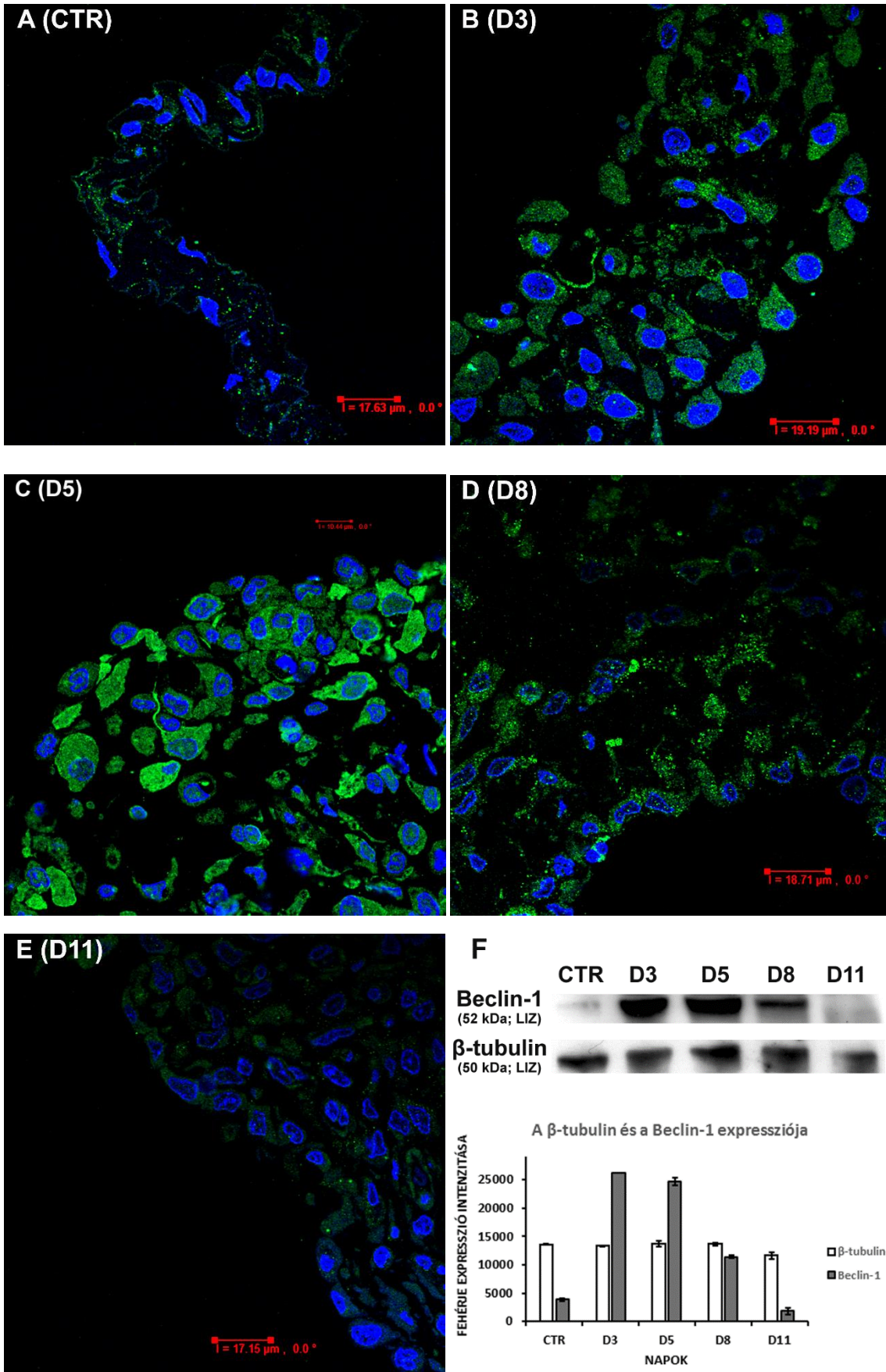
A Beclin-1, a lipid kináz Vps34 komplex tagjaként, döntő szerepet játszik az autofágia indukálásában, szükséges az izoláló membránok, fagofórok kialakulásához (114). Kis mértékű Beclin-1 expresszió azonban nem elegendő az autofágia kiváltásához (115).

Immuncitokémiai és biokémiai eredményeink azt mutatják, hogy a Beclin-1 a kontroll mesothel sejtekben alig detektálható mennyiségben van jelen (**28. ábra/A, F**), azonban a gyulladás 3. napjára expressziója drasztikusan megnő (**28. ábra/B, F**). Az 5. naptól intenzitása kissé csökken ugyan (**28. ábra/C, F**), de a 8. napon még mindig elég jelentős mennyiségben van jelen a mesothel sejtekben (**28. ábra/D, F**). A 11. napon a Beclin-1 expressziója a kontroll sejtekben tapasztalható szintre esik vissza (**28. ábra/E, F**).

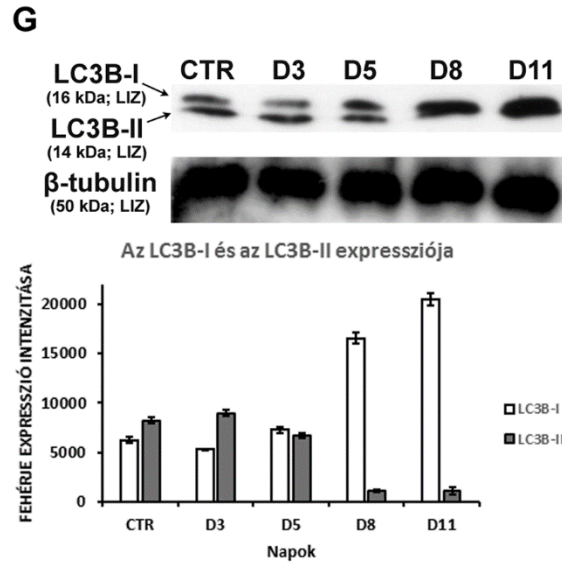
Az LC3B (mikrotubulus-asszociált fehérje 1A/1B könnyű lánc 3B) az autofagoszómák képződésében szerepet játszó egyik faktor, így az autofágia kimutatásának egyik leggyakrabban használt markere. Az autofágia során az LC3B citoszolikus formája (LC3B-I) biokémiai átalakulások után az autofagoszómák membránjához asszociál, és membrán-kötött formában (LC3B-II) fordul elő. Amikor az autofagoszómák lizoszómákkal összeolvadva autolizoszómákat hoznak létre, a belső

membránjukon lévő LC3B-II a membránnal együtt lebomlik a savas hidrolázok által, míg a külső membránegységhez kötött LC3B-II molekulák újra citoszolikussá válnak (116–118).

Munkánk során tehát vizsgáltuk a citoszolikus és a membrán-kötött LC3B expressziójának arányát. Western blot vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a kontroll mesothel sejtekben a két LC3B forma expressziója közel azonos, a Freund adjuváns indukálta gyulladás során azonban a membránhoz-kötött LC3B-II szintje jelentősen csökken, míg a citoszolikus LC3B-I expressziója szignifikánsan megnő (**28. ábra/G**), jelezvén, hogy a regeneráció megindulásával párhuzamosan egy nagyon intenzív autofágia zajlik a mesothel sejtekben.







**28. ábra. A Beclin-1 és az LC3B expressziójának változása a gyulladás és a regeneráció során.** Konfokális mikroszkópia (A-E), Western blot eredmények (F, G). (A): Kontroll mesothel sejtekben Beclin-1 alig detektálható. (B): A gyulladás 3. napján minden kerekded mesothel sejt erősen Beclin-1 pozitív. (C, D): Az 5. napon a Beclin-1 jelintenzitása kissé ugyan csökken, de a 8. napon mindig specifikus, pontszerű jelet ad. (E): A regenerálódott mesothel sejtek Beclin-1 expressziója a 11. napra teljesen lecsökken. (F): Western blot eredményeink alátámasztják immuncitokémiai vizsgálatainkat. A Beclin-1 intenzitását összehasonlítva a töltési kontrollal, a  $\beta$ -tubulinnal láthatjuk, hogy az autofág marker szintje drasztikusan megnő a 3. és 5. napokon. (G): A **citoszolikus és a membrán-kötött LC3B expressziója**. A Freund adjuváns kezelést követő 8. napon, amikor az autofágia nagyon intenzív, az LC3B-II szinte teljes egészében eltűnik, amíg az LC3B-I mennyisége ugrásszerűen megemelkedik. A Beclin-1/ $\beta$ -tubulin és az LC3B-II/LC3B-I expresszióinak intenzitását mutató grafikonok háromszor ismételt Western blot denzitometriás mérésének átlagát és szórását reprezentálja. (LIZ: lizátum; kék: DAPI; zöld: Beclin-1). Bar~10  $\mu$ m.

#### 5.5.4. Az endocitózis szerepének vizsgálata korai és késői endoszómális markerekkel

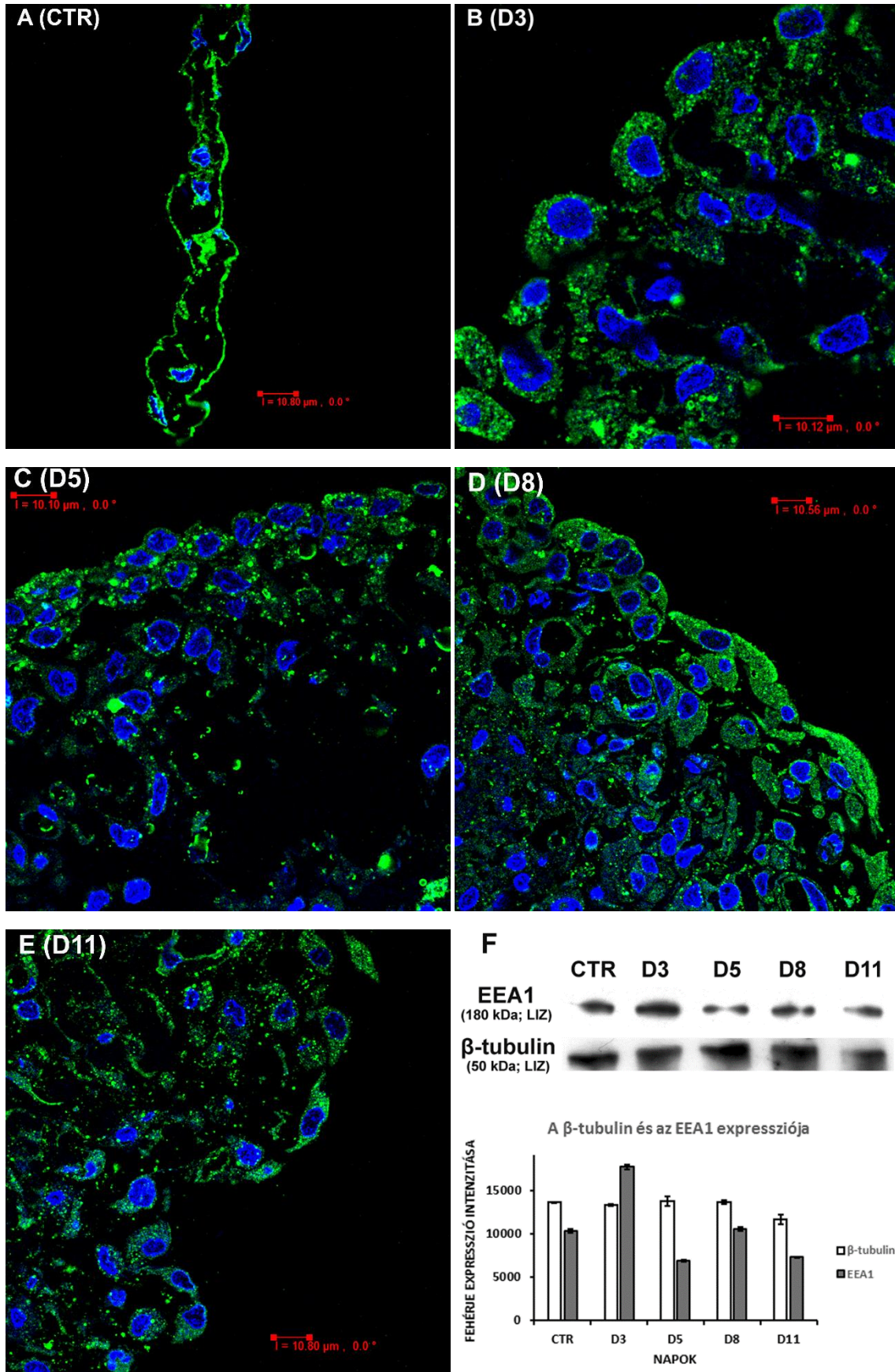
Az endocitotikus útvonal és az autofágia már a korai endoszómák megjelenése után találkoznak egymással (85), létrehozva ezzel egy köztes autofág struktúrát, az amfiszómát (75). Korábbi elektronmikroszkópos és morfometriai megfigyeléseink azt mutatták, hogy a gyulladás és a gyógyulás különböző stádiumaiban lévő mesothel sejtekben az autofág sejtalkotók mellett nagy számban jelennek meg késői endoszómák is. Ezért jogosan tettük fel a kérdést, hogy a progresszív autofágia folyamata együtt jár-e

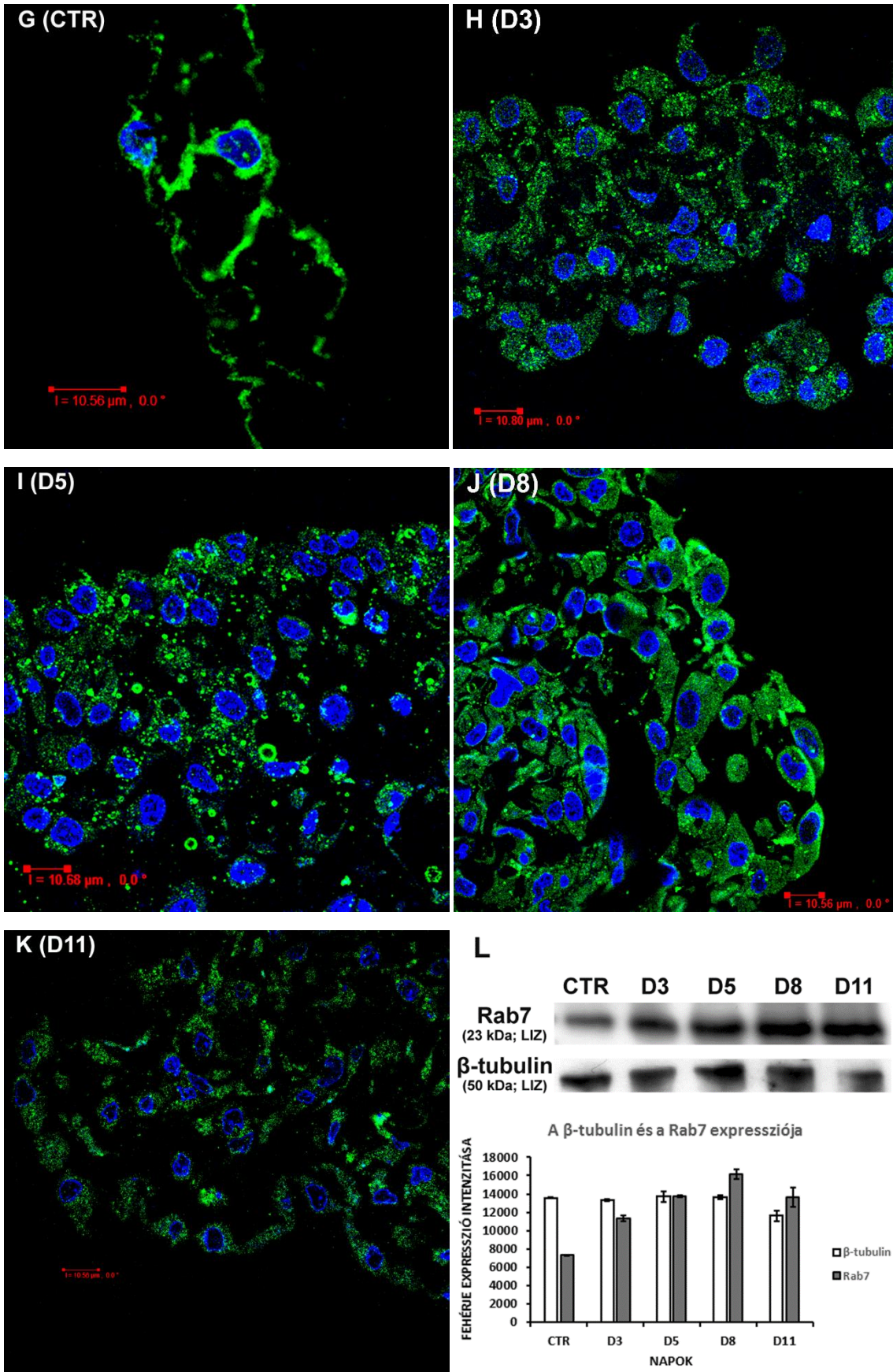
az endocitotikus sejtorganellumok számának növekedésével. A kérdés megválaszolására immuncitokémiai és Western blot vizsgálatokkal követtük nyomon az endocitotikus sejtalkotók megjelenésének dinamikáját a korai (EEA1) és késői (Rab7) endoszómák jellegzetes markereinek segítségével.

Kontroll mesothel sejtekben már jelentős EEA1 expresszió detektálható (**29. ábra/A, F**), amely a Freund adjuváns kezelés hatására nő, elérve maximumát a gyulladás 3. napján (**29. ábra/B, F**). Habár biokémiai eredményeink alapján a korai endoszómális marker szintje csökken az 5. naptól (**29. ábra/F**), expressziója a gyulladás és a gyógyulás során végig jelentős a mesothel sejtekben (**29. ábra/C-F**). Az EEA1 és  $\beta$ -tubulin intenzitásának arányát mutató grafikonon látható, hogy az endoszómális marker expressziója jelentősen megnő a 3. napon (**29. ábra/F**).

A Rab7 egy kis GTP-kötő fehérje, amelynek számos funkciója van. Azon felül, hogy szabályozza a késői endoszómák érését, szerepet játszik a lizoszómák biogenezisében és fenntartásában, segíti az autofág vakuólumok érését és fúzióját endoszómákkal és/vagy lizoszómákkal (119, 120).

Korábbi morфомetriai adataink azt mutatták, hogy a Freund adjuváns injektálása után igen nagy számban jelennek meg multivezikuláris testek a mesothel sejtekben. Immuncitokémiai és Western blot eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy már a kontroll mesothel sejtekben is egy elég jelentős Rab7 expresszió detektálható (**29. ábra/G, L**), amely tovább erősödik a gyulladás 3. és 5. napján (**29. ábra/H, I, L**), majd a 8. napon eléri maximumát (**29. ábra/J, L**), amikor számos, érett autofág sejtorganellumot, főleg autolizozómát tudtunk azonosítani a gyógyulásnak indult mesothel sejtekben. A Freund adjuváns injektálása után 11 nappal a Rab7 intenzitása kissé ugyan csökken, de még mindig jelentős mértékben expresszálódik a mesothel sejtekben (**29. ábra/K, L**). A Rab7 és  $\beta$ -tubulin intenzitását összehasonlítva megállapíthatjuk, hogy a Rab7 expressziója igen jelentős a 8. és a 11. napon is (**29. ábra/L**).



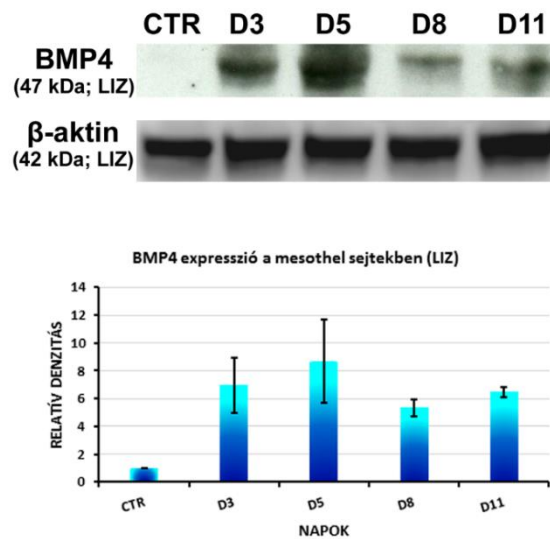


**29. ábra. Az EEA1 és Rab7 expressziója kontroll és kezelt mesothel sejtekben.** Immuncitokémiai (A-E és G-K), Western blot (F és L) eredmények. **Az EEA1 expressziója. (A):** Kontroll mesothel sejtekben nagyon intenzív EEA1 jel látható. **(B):** 3 nappal a Freund adjuváns kezelés után az EEA1 expressziója jelentősen megnő. **(C):** Az 5. napon nagyon erős és specifikus jel detektálható, EEA1-pozitív kör alakú struktúrák azonosíthatóak a sejtekben. **(D):** A 8. napon az EEA1-jel még mindig erős. **(E):** A regeneráció végére (11. nap) az EEA1 jelintenzitása csökken. **(F):** Western blot eredményeink párhuzamba állíthatóak konfokális mikroszkóppal végzett megfigyeléseinkkel. A diagramm az EEA1 és  $\beta$ -tubulin expresszióját hasonlítja össze. **A Rab7 expressziója. (G):** A kezeletlen mesothel sejtek jelentős Rab7 expressziót mutatnak. **(H, I):** A gyulladás 3. és 5. napján a Rab7 jelintenzitása tovább erősödik. **(J, K):** A Rab7 expressziója a 8. napon a legerősebb, majd a 11. napra kissé lecsökken. **(L):** Biokémiai vizsgálataink alátámasztják immuncitokémiai adatainkat. A diagramm a Rab7 és  $\beta$ -tubulin expresszióját hasonlítja össze. Az endoszómális markerek és a  $\beta$ -tubulin intenzitásának arányát háromszor ismételt Western blot mérés denzitometriájának átlag és szórás eredményeit mutatja. Töltési kontroll:  $\beta$ -tubulin. (LIZ: lizátum; kék: DAPI; zöld: EEA1, Rab7). Bar~10  $\mu$ m.

### 5.6. A BMP fehérjék szerepe a mesothel sejtek regenerációjában (MET)

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a TGF- $\beta$  EMT-t, a BMP fehérjék pedig többnyire MET-et indukálnak (56, 57, 121, 122). Vizsgálataink során a továbbiakban ezért arra voltunk kíváncsiak, hogy a BMP fehérjék szerepet játszanak-e a mesothel sejtek gyógyulásában (MET) a gyulladás lecsengése után. A kérdés megválaszolásának céljából immuncitokémiai és biokémiai módszerekkel vizsgáltuk, hogy a mesothel sejtekben termelődik-e BMP, és expresszálják-e a BMP ligand specifikus receptort. Vizsgálatainkhoz a BMP4 és a BMP7 citokinek, valamint a BMPR2, II-es típusú, BMP specifikus receptor ellen termeltetett ellenanyagokat használtuk.

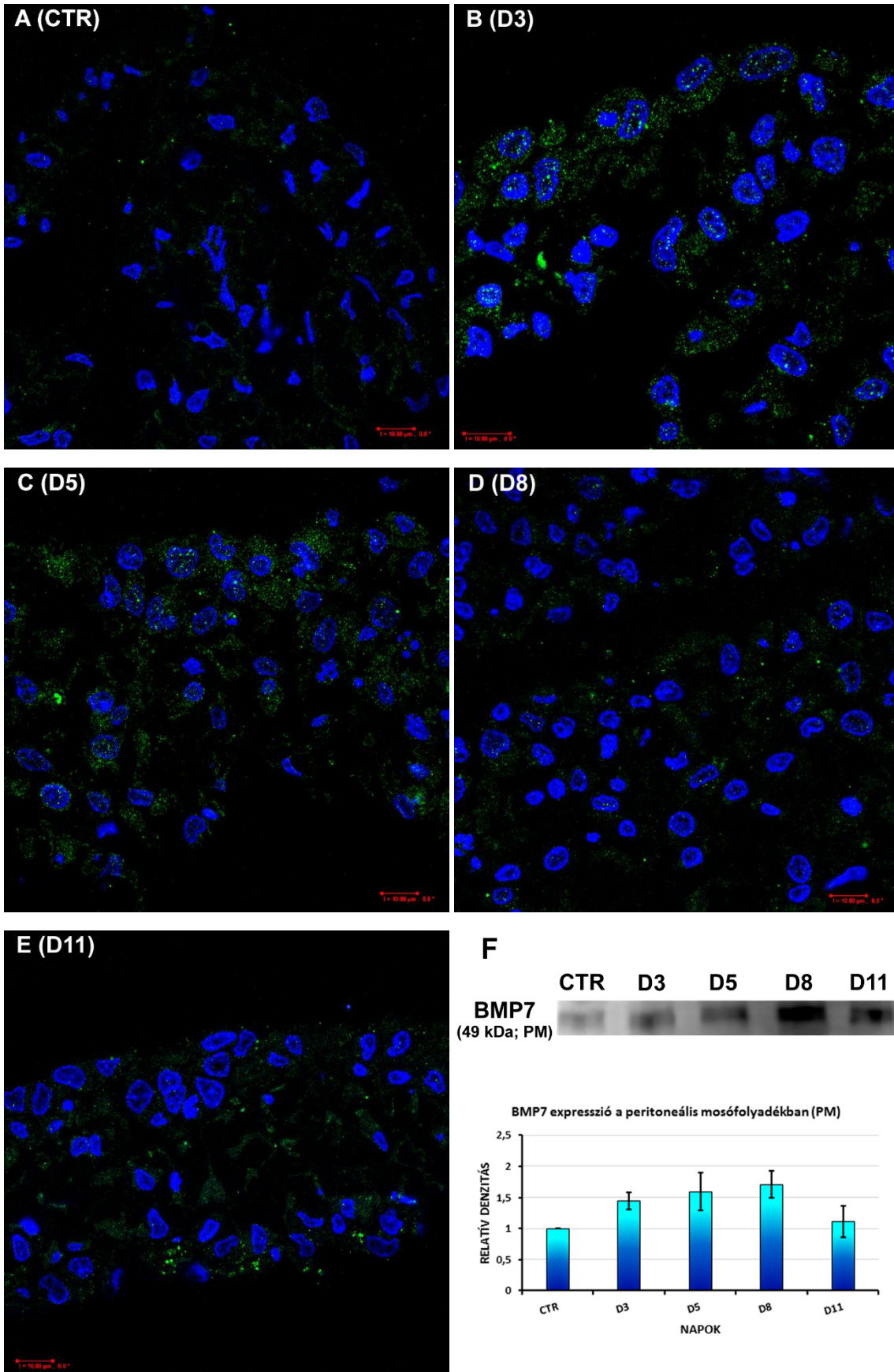
Western blot eredményeink azt mutatják, hogy a kontroll mesothel sejtek nem expresszálják a BMP4-et. A Freund adjuváns injektálását követő 3. napon azonban megjelenik a BMP4 a mesothel sejtek lizátumában, és expressziója fokozódik az 5. napig. Ezt követően, a 8. napon mennyisége kissé csökken, majd a 11. napon újra megemelkedik (**30. ábra**).



**30. ábra. A BMP4 kimutatása: Western blot vizsgálat és a hozzá tartozó denzitometria eredménye.** Töltési kontrollként  $\beta$ -aktint használtunk. (LIZ: lizátum).

A BMP7 immuncitokémiai vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll mesothel sejtek nem expresszálják ezt a citokint (**31. ábra/A**). A gyulladás 3. napján nem túl erős intenzitású, de meglehetősen specifikus, pontszerű BMP7 jelet detektálhatunk a mesothel sejtekben (**31. ábra/B**). A BMP7 expressziója a kezelést követő 5. napon a legerősebb, intenzitása azonban diszkrét, eloszlása pontszerű (**31. ábra/C**). A 8. napon expressziója csökken (**31. ábra/D**), és a regeneráció végén, a 11. napon is meglehetősen alacsony, csak néhány mesothel sejt mutat némi BMP7 pozitivitást (**31. ábra/E**).

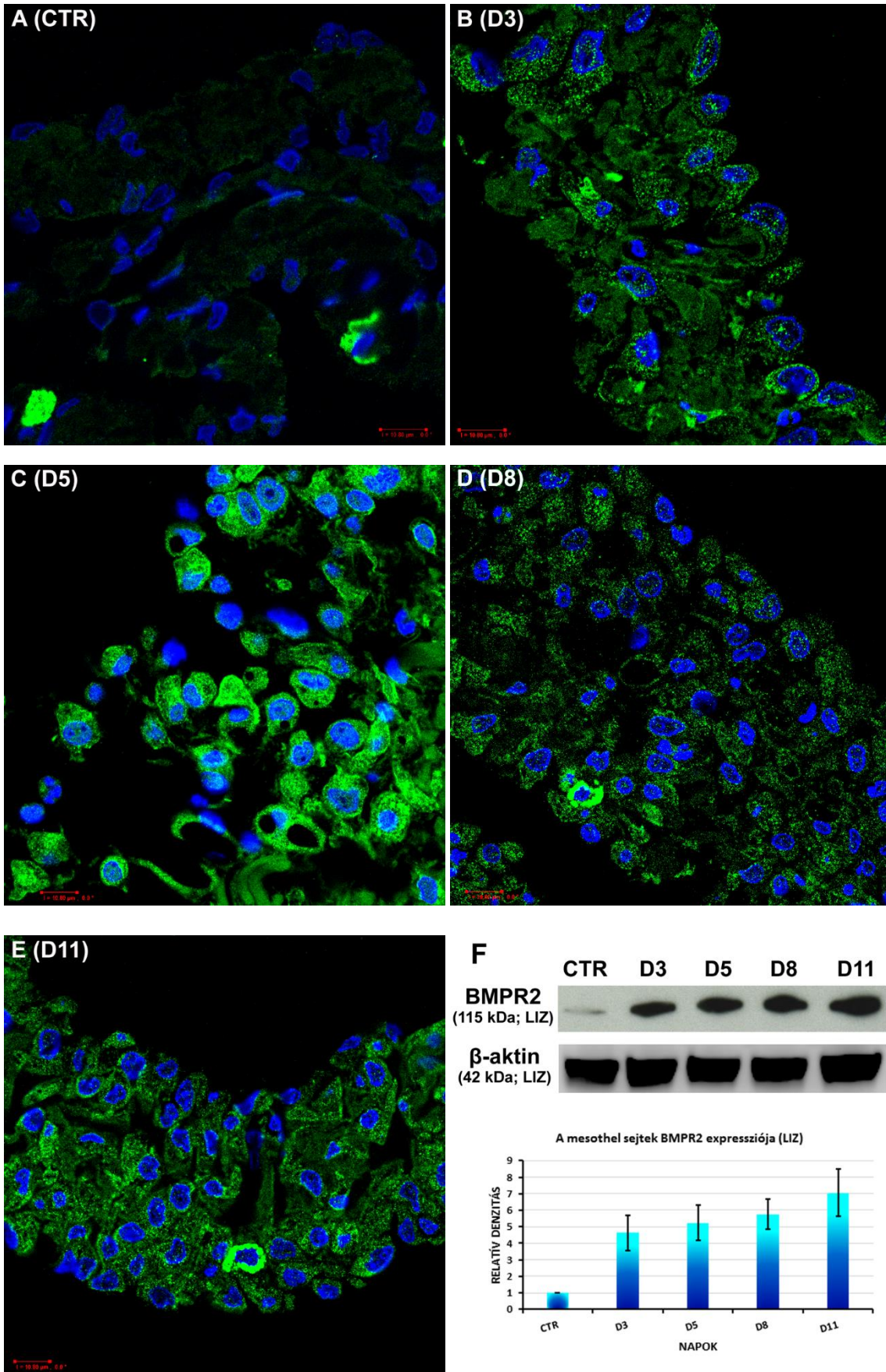
A mesothel sejtek által, kis mennyiségben expresszált BMP7 biokémiai módszerekkel nem detektálható a lizátumban. Ezért tovább vizsgálódtunk, és megnéztük, hogy a peritoneális mosófolyadékban kimutatható-e a BMP7. A hasúri folyadék Western blot vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy már a kontroll mintában jelentős mennyiségben mutatható ki a citokin. Szintje nő a gyulladás 3. napján, majd tovább fokozódik az 5. napon. A BMP7 expressziója a 8. napon éri el maximumát, amikor a mesothel sejtek regenerációja elkezdődik, és még a 11. napon is jelentős mennyiségben van jelen a hasúri folyadékban (**31. ábra/F**).



**31. ábra. A BMP7 kimutatása mesothel sejtekben és a hasúri folyadékban: immuncitokémia és Western blot vizsgálat.** (A): A kontroll mesothel sejtek nem expresszálják a BMP7-et. (B): A gyulladás 3. napján némi BMP7 jel detektálható a mesothel sejtek citoplazmájában. (C): Az 5. napon a legmagasabb a BMP7 expressziója a mesothel sejtekben. (D, E): A 8. és a 11. napon csak nagyon gyenge BMP7 jel figyelhető meg a mesothel sejtekben. (F): Ezzel szemben a kontroll peritoneális mosófolyadékban is mérhető mennyiségben van jelen a BMP7, majd expressziója a Freund adjuváns injektálása után fokozatosan nő. (PM: peritoneális mosófolyadék; kék: DAPI; zöld: BMP7). Bar~10,80 µm.

A BMPR2 vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a kezeletlen mesothel sejtek kis mértékben ugyan, de expresszálják a receptort (**32. ábra/A, F**). A Freund adjuváns kezelést követő 3. napon a BMPR2 expressziója jelentősen megnő (**32. ábra/F**), és specifikus, pontszerű jelet detektálhatunk a mesenterium két oldalán elhelyezkedő, kerekded mesothel sejtekben, és a kötőszövet néhány sejtjében is (**32. ábra/B**). Az 5. napon a receptor expressziója tovább erősödik (**32. ábra/F**), és egy nagyon intenzív jel látható a mesenterium sejtjeiben (**32. ábra/C**). A kezelés után 8 nappal az immuncitokémiai felvételeken az 5. naphoz képest gyengébb jelet detektálhatunk (**32. ábra/D**), Western blot eredményeink azonban kismértékű növekedést mutatnak (**32. ábra/F**). A növekvő tendencia megmarad egészen a 11. napig, a gyógyult mesothel sejtekben intenzív BMPR2 immunjel detektálható (**32. ábra/E**), és a biokémiai eredmények szerint ekkor a legerősebb a mesothel sejtek BMPR2 expressziója (**32. ábra/F**).





**32. ábra. A BMPR2 immuncitokémiai és Western blot vizsgálata a mesothel sejtekben. (A):** Kontroll sejtekben gyakorlatilag nem mutatható ki a BMPR2. **(B):** A gyulladás 3. napján igen specifikus, pontszerű BMPR2 jel detektálható a mesothel sejtekben. **(C, D):** Az 5. napon tovább erősödik a receptor expressziója, majd a 8. napon kissé csökken. **(E):** A regeneráció végére, a 11. napon újra jelentős mennyiségű BMPR2 detektálható a mesothel sejtekben és a kötőszövet sejtjeiben is. (A kötőszövet hízósejtjeiben lévő granulomok megdöbbszerűen erős fluoreszcenciát mutatnak). **(F):** A BMPR2 expressziója a 11. napon éri el maximumát. Töltési kontrollnak  $\beta$ -aktint alkalmaztunk. (LIZ: lizátum; kék: DAPI; zöld: BMPR2). Bar~10,80  $\mu$ m.

### 5.7. A bafilomycin A1 hatása a mesothel sejtek regenerációjára

Annak bizonyítására, hogy az autofágia valóban kulcs szerepet játszik a feleslegessé vált sejtalkotók és fehérjék lebontásával az eredeti laphám morfológia visszaállításában, vizsgáltuk a regeneráció folyamatát az autofágiát gátló bafilomycin A1 kezelés után (**1. táblázat**). *In vivo* kísérleteinkben bafilomycin A1 injektálásával célunk az autofág cargo degradációjának megakadályozása volt az autofagoszómák és lizoszómák közötti fúzió, valamint a V-ATP-ázok közreműködésével végbemenő savasodás gátlásán keresztül. A bafilomycin A1 és Freund adjuváns kezeléseket követően fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével követtük nyomon az autofágia folyamatát.

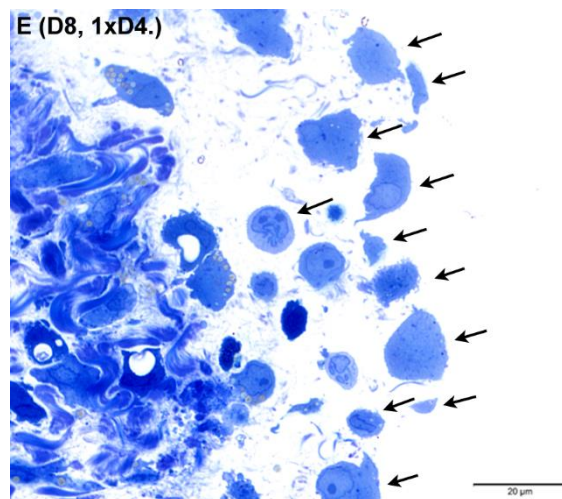
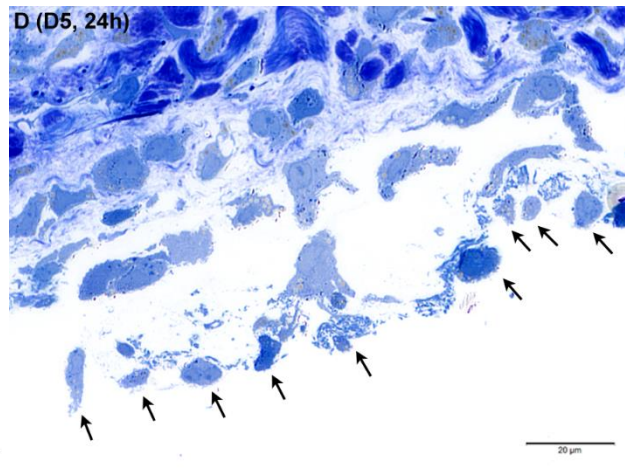
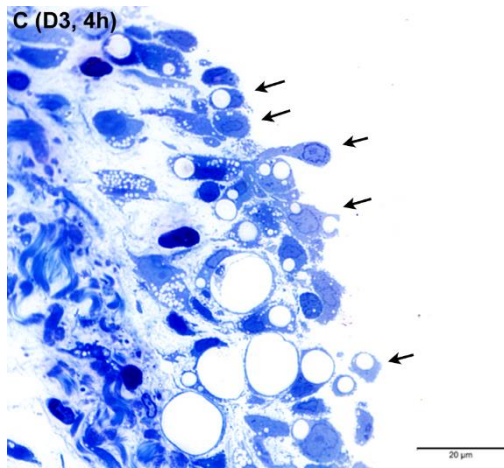
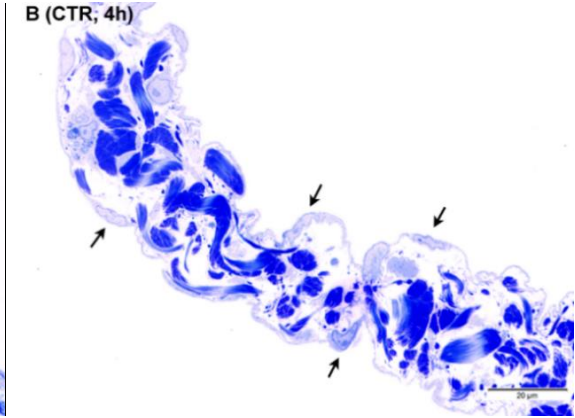
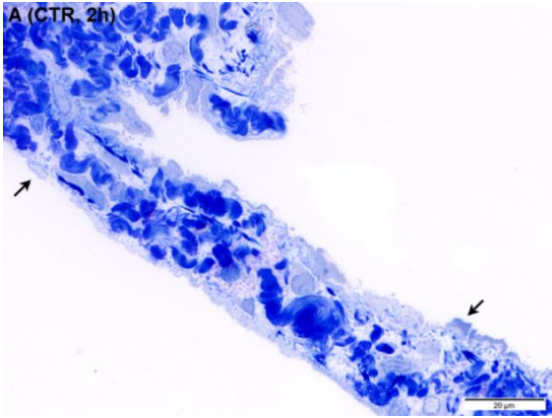
#### 5.7.1. A bafilomycin A1 hatásának vizsgálata fénymikroszkópiával

A bafilomycines kezelés az állatok mesenteriumának morfológiáját nem változtatja meg 2 és 4 óra után sem. A laphám mesothel sejtek egy sejt soros, összefüggő réteget alkotnak a kötőszövet két oldala mentén. Citoplazmájuk vékony, kerekded sejt magjuk alapján viszont könnyedén azonosíthatóak. A két mesothel réteg által közrefogott kötőszövetben gyakoriak a kollagén rostok és a különböző kötőszöveti sejtek (**33. ábra/A, B**).

Ha az állatok a gyulladás 3. napján bafilomycin kezelést kapnak 4 órán át, a gyulladt hashártya szerkezete gyakorlatilag szétesik. Bafilomycin kezelés nélkül a sejtek épek, kerekded, köbös morfológiát öltenek, amelyek között ugyan felbomlanak a sejtkapcsoló struktúrák, de még egy sorba rendeződnek a kötőszövet két oldalán. A bafilomycin kezelés hatására azonban a mesothel sejtek vakuolizáltak, sejtmagjukban a kromatin láthatóan kondenzálódik, és több sorba rendeződnek a kötőszövet mentén. A kötőszövet sejtszelei ugyanilyen drasztikus változáson mennek keresztül (**33. ábra/C**).

Ha az állatokat a gyulladás 4. napján bafilomycinnel oltjuk, majd 24 óra elteltével vizsgáljuk, akkor elmondhatjuk, hogy a gyulladásban lévő mesenterium (5. nap) szerkezete még drámaibb módon változik. A csak Freund adjuvánssal kezelt állatok mesothel sejtszelei a gyulladás hatására ugyan teljesen elveszítik laplaphám morfológiájukat és polaritásukat, de épek és egészségesek. A bafilomycinnel is oltott állatok hashártyájának mesothel sejtszelei azonban tele vannak kisebb-nagyobb vakuólumokkal, környezetükben citoplazma foszlányok és maradványok figyelhetők meg. A kötőszöveti sejtszelei hasonló morfológiát mutatnak, a kollagéntörések tömör, denz kötegekbe rendeződnek (**33. ábra/D**).

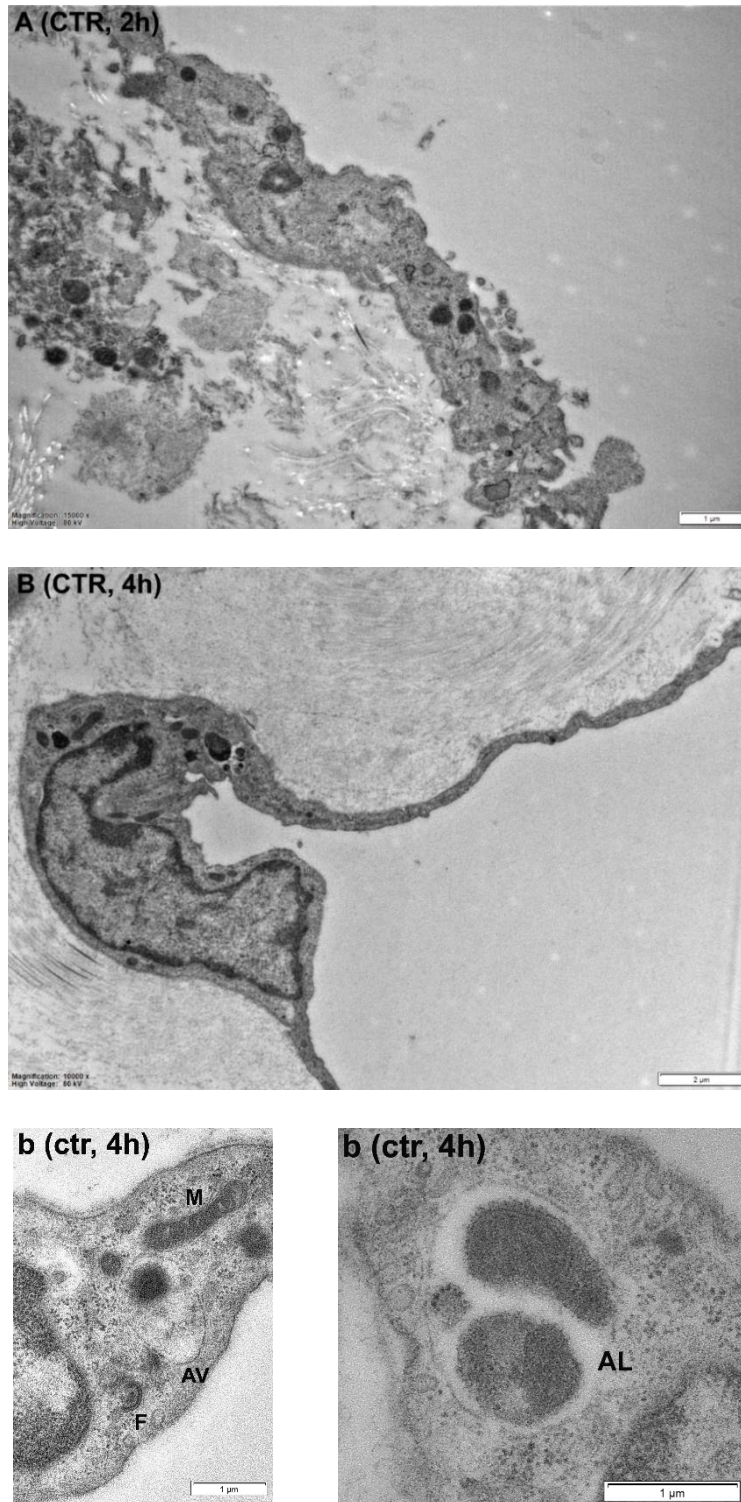
Hasonló változások figyelhetők meg akkor is, ha az állatokat a gyulladás 4. napján kezeljük bafilomycinnel, majd a 8. napon vizsgáljuk. A bafilomycin kezelést nem kapott állatok mesenteriuma és mesothel sejtszelei ekkor már a regeneráció jeleit mutatják. A mesothel sejtszelei zöme még kerekded, de kezdenek újra egy sejtszeletbe rendeződni, és hosszúkásabb nyúlványaik között néhol már fellelhetők sejtkapcsolatok is. A bafilomycin kezelés után azonban a mesothel sejtszelei rendezetlenül, több sorban helyezkednek el a kötőszövet mentén. Citoplazmaszegélyük foszlányos, sejtszelet szerkezetük gyakorlatilag felismerhetetlen, csak a néhol megmaradt sejtszelet azonosítható (**33. ábra/E**).



**33. ábra. A bafilomycin A1 hatása a Freund adjuvánssal nem kezelt és kezelt mesothel sejtekre. Toluidinkékkel festett hashártyák fénymikroszkópos felvételei. (A, B):** A csak bafilomycinnel kezelt (2 és 4 óra), kontroll mesothel sejtek morfológiájukat tekintve nem különböznek a teljesen kezeletlen hashártya mesothel sejtjeitől. **(C):** A Freund adjuváns injekcióját követő gyulladás 3. napján bafilomycinnel is kezelt (4 óra) állatok mesothel sejtjei vakuolizáltak, és az apoptózis kezdetleges jeleit mutatják. **(D):** A gyulladás 5. napján, az egy nappal korábban bafilomycinnel is oltott állatok mesothel sejtjei szétesnek, plazmamembránnal körbevett citoplazma maradványok hasítódnak le róluk, és egyértelműen az apoptózis jegyeit mutatják. **(E):** A gyulladás 8. napján - a négy nappal korábban, egyszer bafilomycinnel oltott - állatok mesothel sejtjei több sorban helyezkednek el a kötőszövet két oldala mentén, és sejt szerkezetük alig ismerhető fel. (Nyílak: mesothel sejtek). Bar=20 µm.

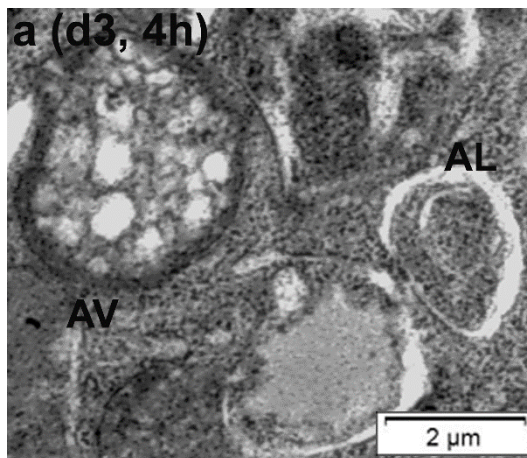
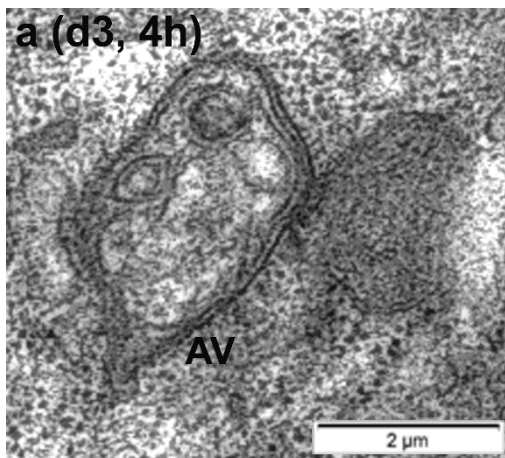
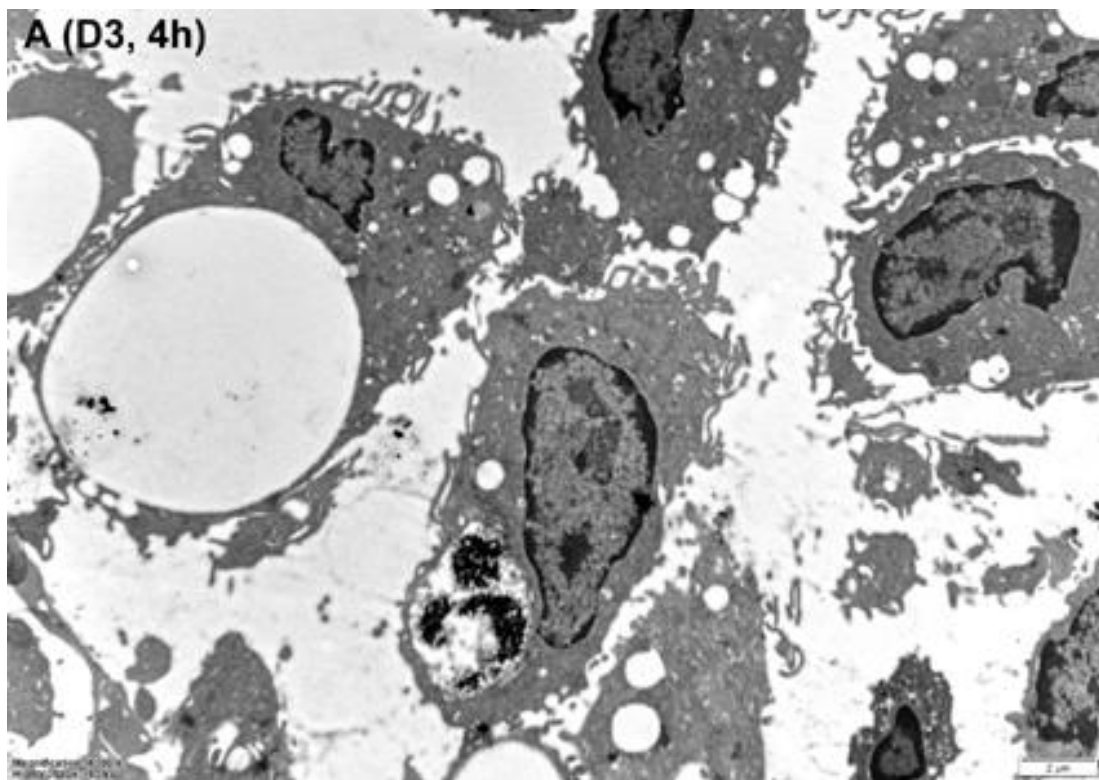
#### 5.7.2. A bafilomycin A1 hatásának elektronmikroszkópos vizsgálata

A csak bafilomycin kezelést (2 és 4 óra) kapott, kontroll állatok hashártyájának mesothel sejtjei hosszan elnyúlt, lapos hámsejtek. Egymással érintkező, vékony nyúlványaik között különböző sejtkapcsoló struktúrák figyelhetők meg, amelyek révén összefüggő, egyetlen sejtréteget alkotnak a kötőszövet két oldalán. Citoplazmájukban elenyésző számú sejtorganelum (endoszómák, lizoszómák, mitokondriumok) látható, szinte csak a kerekded sejtmag dominál. Az autofágiára jellemző sejtorganelumok közül csak néhány fiatal fagofór és nem savasodó autofagoszóma, autolizoszóma látható **(34. ábra/b)**. Caveolák nagy mennyiségben vannak jelen mind az apikális, mind a bazális membránon; clathrin-burkos vezikula csak ritkán figyelhető meg. A kötőszövetben az egybefüggő kollagénrost kötegek rajzolata szépen kivehető **(34. ábra/A, B)**.



**34. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a bafilomycin A1 hatásáról a kontroll mesothel sejtekre. (A, B):** A bafilomycinnel kezelt (2 és 4 óra) kontroll mesothel sejtek morfológiája megegyezik, és sokban hasonlít a kezeletlen hashártya mesothel sejteinek morfológiájához. **(b):** Néhány fiatal autofág struktúra azonosítható a sejtekben. (F: fagofór; AV: autofág vakuólum, autofagoszóma; AL: autolizoszóma; M: mitokondrium). Bar=1, 2 µm.

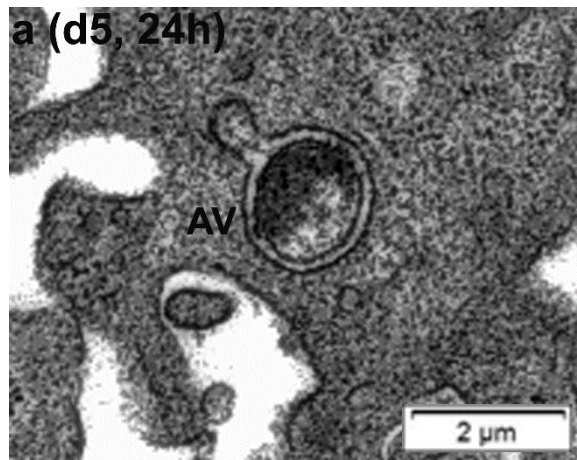
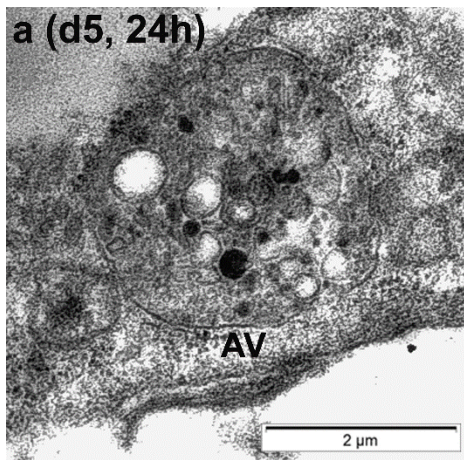
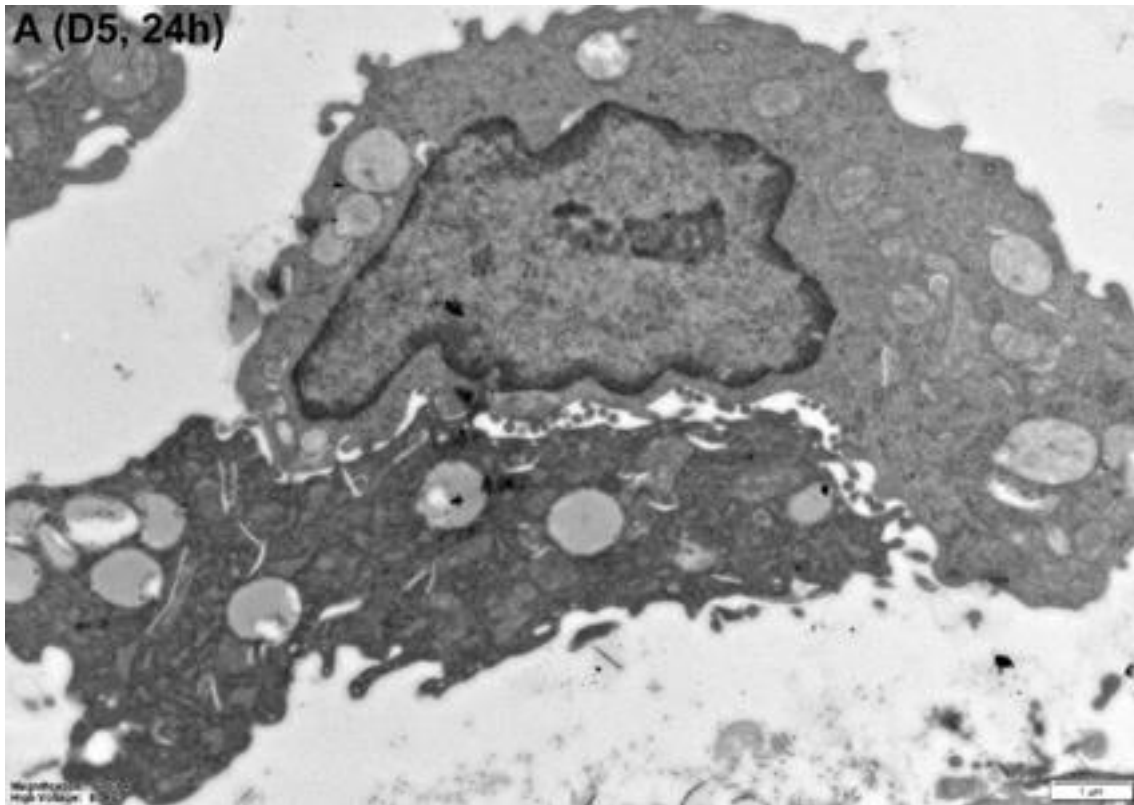
A gyulladás 3. napján vizsgált, 4 órás bafilomycin kezelést kapott állatok hashártyájának mesothel sejtjeiben hatalmas vakuólumok jelennek meg, sejtmagjukban a kromatinállomány erősen kondenzálódik, citoplazmájuk szegélyes foszlányos. A sejtek közvetlen szomszédságában leszakadt citoplazmadarabok figyelhetők meg. Az autofág sejtalkotók közül csak fiatal, kettős membránnal körülvett autofagoszómák és éretlen autolizoszómák azonosíthatóak (**35. ábra/a**). A kötőszövetben lévő sejtek a mesothel sejtekhez hasonló morfológiát mutatnak (**35. ábra/A**).



**35. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a bafilomycin A1 hatásáról a három napos gyulladt, Freund adjuvánsal kezelt mesothel sejtekre. (A):** A Freund adjuváns injektálást követő gyulladás 3. napján, bafilomycinnel kezelt (4 óra) állatok mesothel sejtjei erősen vakuolizáltak, plazmamembránnal határolt citoplazmadarabok fűződnek le róluk. **(a):** A kettős membránnal határolt autofág vakuólumokon kívül csak néhány éretlen autolizoszóma látható a mesothel sejtekben. (AV: autofág vakuólum, autofagoszóma; AL: autolizoszóma). Bar=2 µm.

A gyulladás 5. napján vizsgált, 24 órás bafilomycin kezelést kapott állatok mesothel sejtjei vakuolizáltak, sejtorganellumaik szerkezete gyakorlatilag felismerhetetlen. A mitokondriumok krisztái szétesnek, a durvafelszínű endoplazmás retikulum pedig jelentősen kitágul. Jól láthatóak a sejtekről leszakadt citoplazma maradványok. Egyre gyakoribb az apoptotikus testek megjelenése. Az autofág sejtorganellumok közül csak fiatal autofagoszómák figyelhetőek meg a citoplazmában **(36. ábra/a)**, míg a bafilomycin kezelést nem kapott állatok mesothel sejtjeiben ekkorra már jelentősen nő az autofág vakuólumok és érett autolizoszómák száma, és pontosan nyomon tudjuk követni az autofágia jellegzetes lépéseit az iniciációtól a degradációig. A sejtmagban lévő kromatin a maghártya szélére szorul, és még erősebben kondenzálódik, a magvacska amorf morfológiát mutat **(36. ábra/A)**.

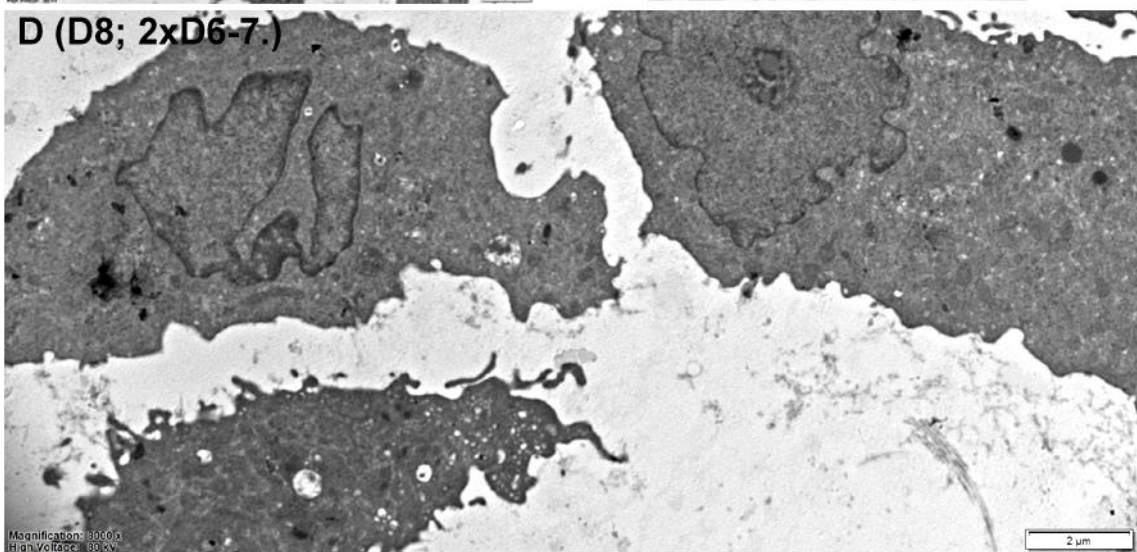
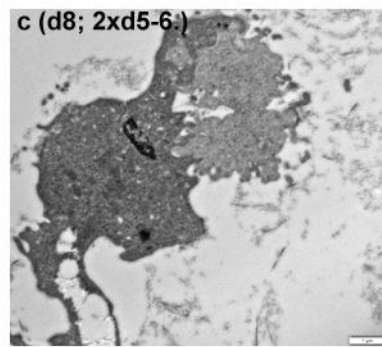
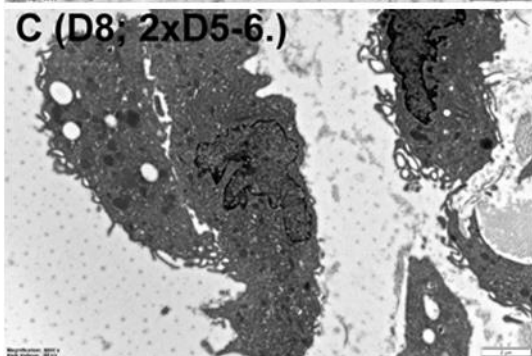
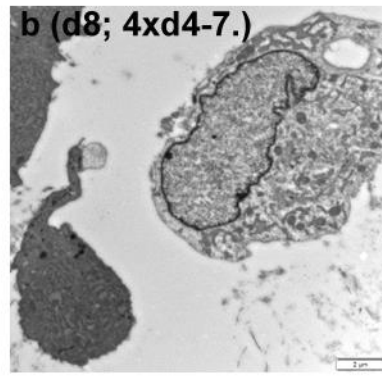
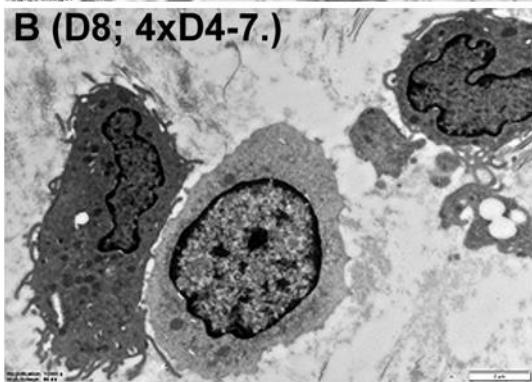
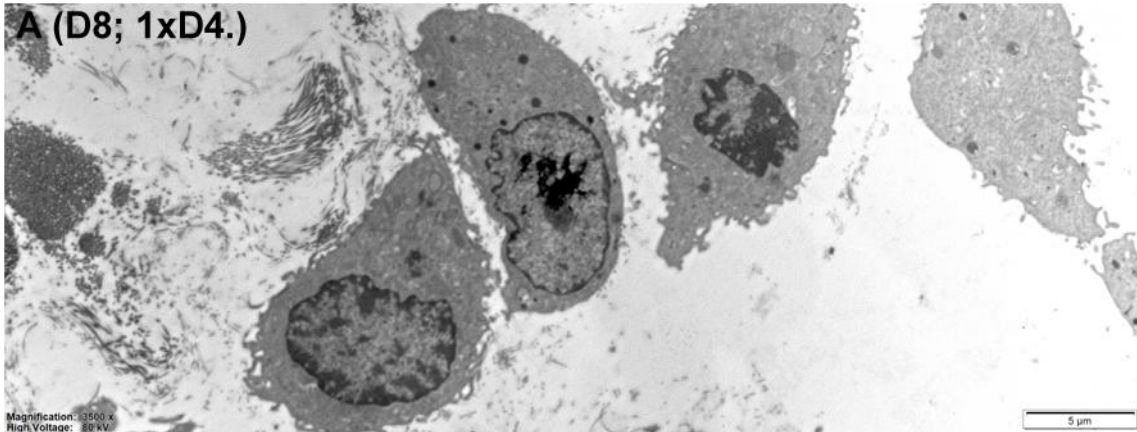




**36. ábra.** Elektronmikroszkópos felvételek a bafilomycin A1 hatásáról az öt napos gyulladt, Freund adjuvánssal kezelt mesothel sejtekre. (A): A gyulladás 4. napján bafilomycinnel oltott, és az 5. napon kinyert hashártyák mesothel sejtjeiről kisebb-nagyobb apoptotikus blebek szakadnak le, citoplazmájukban a sejtorganelumok drasztikus morfológiai változásokon mennek keresztül. (a): Az autofág struktúrák közül csak fiatal autofagoszómák figyelhetők meg. (AV: autofág vakuólum, autofagoszóma). Bar=1, 2  $\mu$ m.

A fénymikroszkópos vizsgálatok során az egyszeres és a kombinált bafilomicynes kezelések között a 8 napos gyullados kísérleti csoportban nem találtunk különbséget. Ultrastrukturális megfigyeléseink során is csupán apró eltérések vannak a csoportok között.

Általánosságban elmondható, hogy a bafilomicin kezelés után, a gyulladás 8. napján a mesothel sejtek regenerációjának a jelét sem lehet látni, sőt a sejtek pusztulnak, és az apoptózis jezeit mutatják (**37. ábra/A-D**). A sejtek zsugorodnak, a vakuolizáltság mértéke fokozódik; olykor méretes, plazmamembránnal határolt részletek szakadnak le a sejtekről. Citoplazmájuk foszlányos, a bleb képződés jelei egyértelműek. A citoplazma állománya homogén, csak egy-kettő, hajdan egészséges sejtorganellum, és a le nem bontott törmelék denz maradványa figyelhető meg bennük. A durva felszínű endoplazmás retikulumok duzzadtak, kitágultak. Sejtmagjukban a magvacska szétesik, a kromatin marginális kondenzációja igen jelentős. A legsúlyosabb morfológiai változást, és a legtöbb, apoptózissal elpusztult sejtet a kombinált bafilomicynes kezelések közül abban a két csoportban figyeltük meg, amikor 4 napon keresztül (**37. ábra/B, b**), illetve amikor az 5. és a 6. napokon kapták az állatok a bafilomicin A1 kezelést (**37. ábra/C, c**).



**37. ábra. Elektronmikroszkópos felvételek a bafilomycin A1 hatásáról a nyolc napos gyulladt, Freund adjuvánssal kezelt mesothel sejtekre.** Az egyszeres és kombinált kezelések sorozatában szignifikáns morfológiai különbséget nem tapasztaltunk a csoportok között. **(A):** A gyulladás 4. napján bafilomycinnel oltott, és a 8. napon vizsgált állatok mesothel sejtjei. **(B):** A Freund adjuváns injektálását követő 4. naptól a 7. napig bafilomycinnel oltott, és a 8. napon vizsgált állatok mesothel sejtjei. **(C):** A gyulladás 5-6. napján bafilomycinnel oltott, és a 8. napon vizsgált állatok mesothel sejtjei. **(b, c):** Kinagyított felvételek a „B” és „C” állatcsoportok hashártyájának egy-egy mesothel sejtjéről. A legtöbb, apoptózissal elpusztult mesothel sejtet; valamint a legdrasztikusabb bleb képződést a „B” és a „C” csoportokban találtuk. **(D):** A Freund adjuváns injektálását követő 6-7. napokon bafilomycinnel oltott, és a 8. napon vizsgált állatok mesothel sejtjei. Bar= 1, 2, 5 µm.

## 6. Megbeszélés

Korábbi morfológiai és molekuláris vizsgálataink során igazoltuk, hogy a patkány hashártya mesothel sejtjei Freund adjuváns indukálta gyulladás hatására mesenchymális átalakuláson mennek keresztül (EMT II) (41, 96, 123). Kimutattuk, hogy e folyamat során a hámsejtek makrofág markereket (pl. ED1, OX-43) expresszálnak (41), fagocitotikus aktivitásuk megnő (97), gyulladásos citokineket (GM-CSF, TGF- $\beta$ , TNF $\alpha$ ) termelnek, receptoraikat expresszálják (67, 96–98). *In vitro* kísérleteink, - amelyek során primer mesenterium tenyészeteket kezeltünk GM-CSF-fel, TGF- $\beta$ -val, valamint a két citokin elegyével - alátámasztották, hogy mindkét citokin hasonló fenotípusos átalakulást indukál, mint a Freund adjuváns; GM-CSF kezelés hatására fokozódik a makrofág ED1 expressziója; a mesothel sejtek termelik a GM-CSF-t, és expresszálják a GM-CSF receptort (67, 98).

A GM-CSF hematopoetikus növekedési faktor és fontos immunmodulátor, amely számos sejttípusban termelődik (64, 66). Expressziója erősen szabályozott folyamat, amelyet endotoxinok és gyulladásos mediátorok (TNF, IL-1, IL-6,  $\gamma$ -interferon) regulálnak leginkább (66), de növekedési faktorok (például az epidermális növekedési faktor) és a lipopoliszacharidok is indukálhatják termelődését (64, 66). A hematopoietin család tagjaként, a GM-CSF döntő szerepet játszik a dendritikus sejtek érésében; a granulociták és makrofágok differenciálódásában, túlélésében és aktiválásában; az NK-sejtek és az alveoláris makrofágok túlélésében és differenciálódásában. Mindemellett azonban számos jelentős, nem hematopoetikus funkciója is van, amelynek segítségével hozzájárul az immunrendszert szabályozó gyulladásos válaszok kialakításához (65). Korábbi munkánk során már bebizonyítottuk, hogy a Freund adjuváns indukálta gyulladás során a patkány hashártya mesothel sejtjei GM-CSF-t termelnek (67, 98).

A GM-CSF heteromer receptorához kötve képes hatását kifejteni. Ez a receptor komplex egy ligandumra specifikus, és azt megkötő  $\alpha$  alegységből (GM-CSFR  $\alpha$ ), valamint a szignál transzdukcióért felelős  $\beta$  alegységből (GM-CSFR  $\beta$ ) áll (71, 72), amelyet számos hematopoetikus és nem hematopoietikus sejttípus is képes expresszálni (64, 66), így például a mesothel sejtek is (98).

Mára már jól ismertek GM-CSF által indukált jelátviteli útvonalak és a jelátvitelben szerepet játszó molekulák is. Kevésbé ismert azonban, hogy a jelátviteli folyamatok beindulásához szükséges-e a receptor internalizációja. Bár vannak irodalmi adatok, amelyek a GM-CSF receptor internalizációját leírják (124–127), ezek közül néhány arra utal, hogy 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 gátoltuk, a GM-CSF kezelés hatására sem ment végbe a mesothel sejtek mesenchymális átalakulása, és nem expresszálták a makrofág ED1 markert sem (98). Ezek az adatok kétségtelenül azt sugallják, hogy a GM-CSF receptor internalizációja elengedhetetlen az EMT-hez vezető jelátviteli utak beindításához.

Munkánk során tehát első lépésben a szignál transzdukcióért felelős GM-CSF receptor  $\beta$  expresszióját vizsgáltuk a mesothel sejtekben a gyulladós folyamat és a gyógyulás során. Eredményeink azt mutatták, hogy a receptor  $\beta$  expressziója a Freund adjuváns kezelés hatására jelentősen megnő, a gyulladás indukcióját követő 5. nap után azonban fokozatosan csökken.

Tekintettel arra, hogy előző vizsgálataink eredményei egyértelműen azt mutatták, a receptor internalizációja elengedhetetlenül szükséges a GM-CSF-indukálta jelátvitelhez, vizsgáltuk, milyen útvonalon és milyen sejtorganelumok közreműködésével megy végbe az internalizáció. Immuncitokémiai vizsgálataink során különböző endocitikus markerek segítségével (cavolin-1, EEA1, Rab7, Rab11a), kettősen jelölt fagyasztott fél- és ultravékony metszeteken követtük nyomon a GM-CSF receptor  $\beta$  sejten belüli útját az EMT és a MET különböző időpontjaiban.

Morfológiai és statisztikai kísérleteink során a receptor  $\beta$  és a caveolin-1 közti legmagasabb kolokalizációt az 1 órás *in vitro* GM-CSF kezelést követően, és a regeneráció végeztével (11. nap) mértük. Ezek az eredmények azt igazolják, hogy a GM-CSF receptor  $\beta$  internalizációja caveolin-mediált endocitózis révén megy végbe. A caveolák 50-100 nm átmérőjű, palack alakú, koleszterinben és szfingolipidben gazdag, caveolin és cavin tartalmú plazmamembránrészletek invaginációi (128–131), és igen nagy számban vannak jelen a mesothel sejtek felszínén.

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

A korai endoszómák számos funkciót látnak el a sejtek életében. Fogadják az újonnan felvett cargo-t a plazmamembrán felől, az endocitotikus útvonalak fő osztályozó és válogató állomásai, és kapcsolatban állnak a Golgi-készülékkel is. Mindemellett „szignaling organellumként” is funkcionálnak, scaffold fehérjék révén ugyanis fizikai találkozási platformot biztosítanak a downstream jelátviteli partnerek számára. Továbbá azáltal, hogy az internalizált receptorokat intraluminális vezikulákba csomagolva, késői endoszómákkal a degradáció útjára küldik, regulálni tudják a különböző jelátviteli mechanizmusokat (105, 132). A korai endoszómák nemcsak a klasszikus, clathrin-mediált endocitózis útján fogadnak vezikulákat, hanem kapcsolatban állnak számos más, clathrin-független útvonallal is, beleértve a caveolin-, ARF6- és GEEC-függő endocitotikus folyamatokat is (107, 133).

Ismeretes, hogy az endocitózissal felvett cargo a korai endoszómákból reciklizáló vagy késői endoszómákba is kerülhet. A reciklizáló endoszómák révén az internalizálódott anyag - gyakran receptor - visszakerül a plazmamembránra. A másik út a korai endoszómák érésével keletkező késői endoszómák felé vezet, amelyek lizoszómákkal fúzionálva biztosítják a sejtekbe jutott cargo lebontását (107). Annak érdekében, hogy nyomon kövessük a GM-CSF receptor  $\beta$  további, sejten belüli útját, kolokalizációs immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk a receptor  $\beta$  és késői (Rab7), valamint a reciklizáló (Rab11a) endoszómális markerekkel. A Rab család tagjai, mint a Rab7 és a Rab11a GTP-áz fehérjék, a transzportvezikulák egyik legfontosabb azonosító fehérjéi, és mind az endocitotikus, mind a szekréciós útvonalak mester regulátorai (107, 134, 135).

Habár a kontroll mesothel sejtek csak kis mennyiségben expresszálják a GM-CSF receptor  $\beta$  alegységét, ezek a receptorok már ekkor jelen vannak reciklizáló és

késői endoszómákban is, jelezvén, hogy a kontroll sejtekben egy normál, egyensúlyi állapotot fenntartó endocitotikus ciklus zajlik, amelyben a receptorok egy része reciklizál, másik része lebomlik. Az *in vitro* indukált EMT során a kolokalizáció mértéke jelentősen csökken, de több GM-CSF receptor  $\beta$  alegység mutatható ki a késői endoszómákban. A Freund adjuváns indukálta gyulladás 3. napján ez az arány azonban megfordul, a mesothel sejtek citoplazmájában jóval nagyobb számban vannak jelen receptor  $\beta$ - és Rab11a-pozitív reciklizáló endoszómák, mint kettősen jelölt késői endoszómák. Ezek az adatok egyértelműen arra utalnak, hogy a gyulladás ezen időpontjában jelentősebb mennyiségű receptor kerül vissza a plazmamembránra, ezáltal egy újabb endocitotikus ciklusban vehet részt, fenntartva ezzel az EMT folyamatát. Az 5. napon ismét egyensúlyi állapotban van a receptor  $\beta$  reciklizációja és degradációja. Amikor azonban kezdetét veszi a regeneráció (8. nap), jóval több kettős-jelölt, receptor  $\beta$ -t is tartalmazó késői endoszóma figyelhető meg a mesothel sejtekben, jelezvén, hogy az internalizálódott receptor degradációja megkezdődött.

Attól függően, hogy a GM-CSF receptor aktivációja során szerin vagy tirozin aminosavon foszforilálódik, a GM-CSF által indukált jelátviteli útvonalak nagyon változatosak lehetnek. Irodalmi adatok azt mondják, hogy az exogén GM-CSF koncentrációja erősen befolyásolja azt, hogy a receptor  $\beta$  szerinen vagy tirozinon foszfoszforilálódik (72). A legismertebb GM-CSF által aktivált jelátviteli utak a MAPK, a PI3K-Akt-mTOR, az NF $\kappa$ B és a JAK-STAT útvonalak (73). Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok szerint a JAK2-STAT5 jelátvitel képes EMT-t indukálni (136), munkánk során ezt a jelátviteli mechanizmust vizsgáltuk.

A tirozin kináz receptorokkal ellentétben, a GM-CSF receptornak nincs belső, úgynevezett „intrinsic” tirozin kináz aktivitása, ezért a későbbi transzdukciós lépésekhez elengedhetetlenül szükséges, hogy a receptor  $\beta$  alegységéhez társuljon a kináz aktivitású JAK2. A receptorhoz asszociált JAK2 képes transzfoszforilálni a  $\beta$  receptort, amely azután indukálja a jelátviteli folyamatokat (72). A GM-CSF ligand kötődése receptorához a JAK2 aktivációjához, foszforilációjához vezet, amely nemcsak a receptort, hanem a downstream STAT5 faktort is foszforilálja.

A STAT transzkripció faktorok számos citokin, hormon és növekedési faktor által stimulált intracelluláris jelátviteli útvonal nélkülözhetetlen résztvevői (137). A



STAT5 faktornak 2 izoformája létezik, a STAT5A és STAT5B, amelyeket két különböző, de szorosan kapcsolt gén kódol humánban (a 17-es kromoszómán) és rágcsálóban is (a 11-es kromoszómán) (138–140). Aminosav szekvenciájuk mintegy 91%-ban megegyezik, csak az amino- és a karboxi-terminális régióik eltérőek (139, 141). A STAT fehérjék egy konzervált pozícióban lévő tirozinjának foszforilációja elengedhetetlenül szükséges transzkripciós aktivitásukhoz, ez a foszforilációs esemény váltja ki dimerizációjukat, ez szükséges nukleáris transzlokációjukhoz, és ez biztosítja kötődésüket a STAT specifikus promóter szekvenciákhoz. A STAT fehérjék SH2 doménjük révén kötődnek a tirozinon foszforilált citokin receptorokhoz, majd a Janus kinázok magukat a STAT fehérjéket is foszforilálják egy konzervált, C-terminálison lévő tirozin aminosavon. A foszforilált, aktív STAT-ok ezután disszociálnak a receptorról, és homo- vagy heterodimert képezve azonnal belépnek a sejtmagba, ahol specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődnek, és szabályozzák a célgének transzkripcióját (142). A STAT fehérjék mindemellett szerin aminosavakon is képesek foszforilálódni, amely kiegészítheti transzkripciós működésüket (109, 143). Ezek a foszforilációs események eltérő jelátviteli utak eredményeként következnek be, és döntő jelentőségűek a STAT faktorok aktiválásában, transzkripciót reguláló funkciójuk ellátásában (109).

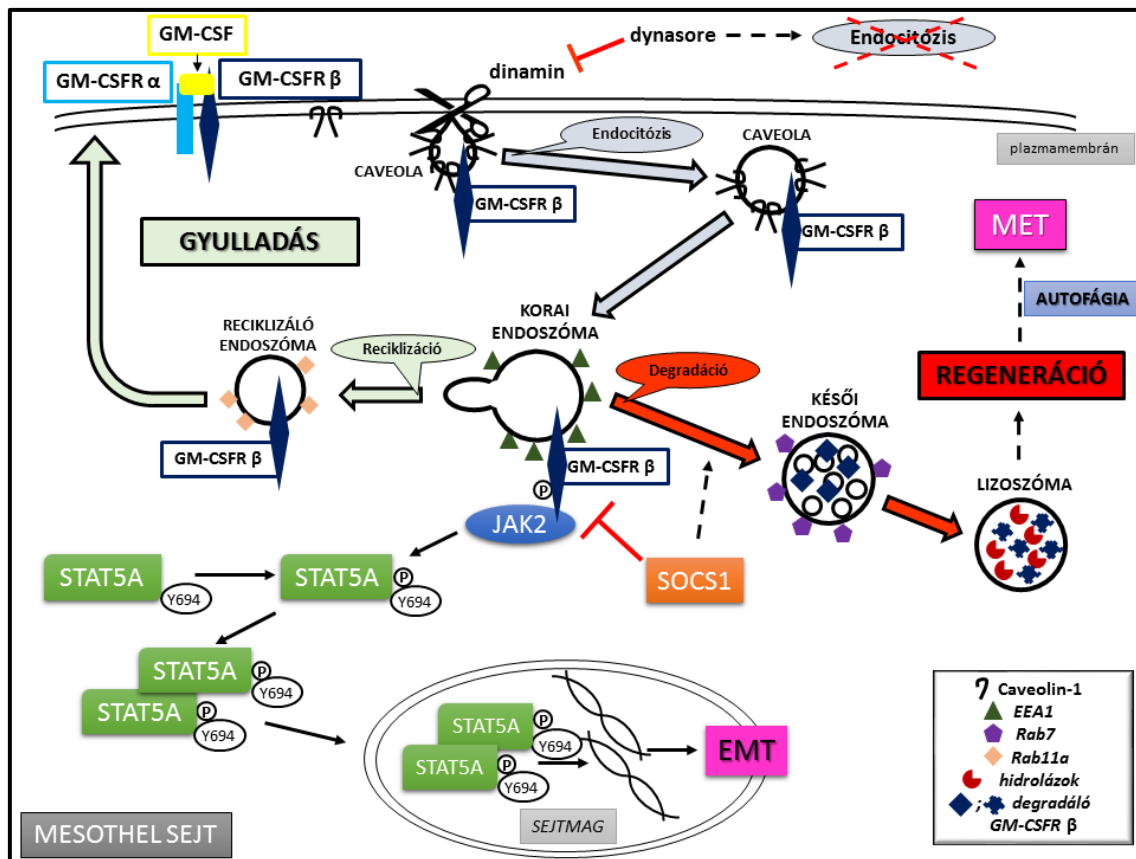
Tekintettel arra, hogy a STAT5 a GM-CSF jelátvitel egyik kulcseleme, munkánk következő lépésében ezen transzkripciós faktor különböző aminosavakon foszforilált formáinak expressziós és lokalizációs változásait vizsgáltuk a gyulladás és a gyógyulás alatt. Immuncitokémiai és Western blot eredményeink azt mutatják, hogy a STAT5 tirozinon foszforilált, aktív formája kis mennyiségben már a kontroll mesothel sejtekben is azonosítható, expressziója jelentősen megnő a gyulladás 3. napján, és ebben az időpontban nagy mennyiségben detektálható a sejtek citoplazma és magfrakciójában is. Az 5. napon expressziós szintje mérséklődik, majd a regeneráció előrehaladtával (8. és 11. nap) drasztikusan csökken, és kis mennyiségben csak a mesothel sejtek sejtmagjában mutatható ki. Annak bizonyítására, hogy a GM-CSF receptor internalizációja valóban elengedhetetlen a GM-CSF által indukált jelátviteli folyamatok lejátszódásához, a receptor internalizációját dynasore-ral gátoltuk, és vizsgáltuk a tirozin-foszforilált STAT5A expresszióját dynasore-ral és GM-CSF-fel kezelt (*in vitro*) túlélő hashártya tenyészetek mesothel sejtjeiben. Ha a GM-CSF receptor  $\beta$  dinamin-függő endocitózisát dynasore kezeléssel gátoljuk, a mesothel sejtekben nem

detektálható aktív, p-STAT5A. Ezek az eredmények egyértelműen azt igazolják, hogy a GM-CSF jelátviteléhez a receptor  $\beta$  internalizációja elengedhetetlenül szükséges.

Ismert ugyan, hogy a STAT5 transzkripciós működését elősegíti szerinen való foszforilációja (109), ezen foszforiláció pontos biológiai jelentősége azonban még nem teljesen tisztázott. Irodalmi adatok igazolják, hogy a STAT5 konstitutív aktiválása biztosítja a sejtek proliferációját és túlélését, amelyek citokin-független sejtexpanziót eredményeznek. Jól ismert az is, hogy a STAT1 és STAT3-tól eltérően a STAT5 faktorok nem szubsztátjai az ERK fehérjéknek, így aktiválásuk valószínűleg eltér a többi STAT fehérjétől. Számos más kinázról tudjuk viszont, hogy képesek szabályozni a STAT5A izoformájának szerinen való foszforilációját, beleértve a ciklin-függő kinázokat, a stressz kinázokat és a Pim-kinázokat (143). A STAT5A és STAT5B szerinen foszforilált formájának vizsgálata során szignifikáns különbséget csak a kontroll mesothel sejtekben detektáltunk, mivel p-STAT5B a kezeletlen sejtekben még nem expresszálódik. A Freund adjuváns kezelést követően azonban mindkét izoforma szerinen foszforilált formája végig jelentős mértékben expresszálódik még a regeneráció ideje alatt is. Az azonban, hogy milyen típusú kinázok és regulátor molekulák felelősek a STAT5A és B transzkripciós faktorok szerinen történő foszforilációjáért, és mi a biológiai jelentőségük a mesothel sejtekben, még nem ismert.

A jelátviteli utak általában nem csak egyszerűen lecsengenek, hanem létezik egy vagy több negatív regulátor molekula, amely segíti a jelátviteli folyamat leállítását. A SOCS fehérjék családja a JAK-STAT útvonalon keresztül fellépő gyulladáscsökkentő citokinek gátló molekulái. A humán genomban kódolt 8 SOCS fehérje közül (SOCS1-7 és a CIS) mindegyik tartalmaz olyan konzervált régiókat, amelyek segítségével több ponton is tudják gátolni a citokin-JAK-STAT jelátviteli útvonalakat (110, 111, 142). Centrális SH2 doménjük révén képesek kötődni a tirozinon foszforilált kinázokhoz és citokin receptorokhoz, elfoglalva azokat a kulcsfontosságú szubsztát-kötő helyeket, amelyek normál esetben biztosítják a downstream partnerek aktiválását, így módon blokkolni tudják a későbbi foszforilációs folyamatokat. A másik kulcsfontosságú szabályozó régiójuk a C-terminálison található, úgynevezett SOCS-boksz, amely az elongin B/C komplexhez asszociálva a Cullin5 toborzásán keresztül katalizálja a tirozinon foszforilált jelátviteli molekulák (kinázok és receptorok) ubiquitinilálását, és degradatív útvonalra terelését (110, 111). A család leghatékonyabb tagja a SOCS1, amely az

immunválasz kialakításáért felelős számos citokin elsődleges szabályozója (110). A SOCS1 kináz gátló doménje (KIR domén) nagy specifitással képes megcélozni a kinázok szubsztrát-kötő helyeit, ily módon közvetlenül is gátolni tudja a JAK1, JAK2 és TYK2 nem-receptor tirozin kinázok katalitikus aktivitását, ezáltal blokkolja a későbbi foszforilációs folyamatokat a jelátvitelben (110). Immuncitokémiai eredményeink igazolták, hogy meglepő módon a kontroll és kezelt mesothel sejtekben is expresszálódik a SOCS1, eloszlása diffúz. A gyulladás 3. napján expressziója azonban csökken, jelezvén, hogy ekkor a GM-CSF jelátvitel nem gátolt. Mindez azt is magyarázza, hogy miért ekkor a legmagasabb a JAK által tirozinon foszforált STAT5A transzkripciós faktor expressziója. A gyulladás csúcspontjában, és azt követően (5.-8. nap), amikor egy nagyon diffúz és intenzív SOCS1 expressziót detektáltunk a mesothel sejtekben, jelentősen csökkent a STAT5A tirozinon foszforilált formájának expressziós szintje, ami azt jelzi számunkra, hogy a SOCS1 a JAK2 kináz aktivitását gátolva represszálta a STAT5 foszforilációját, ezzel a jelátvitelt is. A SOCS1 vizsgálata során kapott eredményeink választ adhatnak a GM-CSF receptor  $\beta$  expressziójának változásaira is. Tekintettel arra, hogy a SOCS1 a tirozinon foszforilált kinázokat és citokin receptorokat is a fent említett mechanizmussal ubiquitin-mediált degradációra tudja küldeni, feltételezhető, hogy a mi rendszerünkben is szerepet játszik a GM-CSF receptor  $\beta$  degradatív útvonalra terelésében, amelynek eredményeként csökken a receptor  $\beta$  expressziós szintje. Bár néhány kutatócsoport szerint a GM-CSF receptor lebontása proteaszómákban zajlik (144), a mi kísérleti adataink egyértelműen azt igazolják, hogy a receptor  $\beta$  lebontása a klasszikus, korai-késői endoszóma, lizoszóma útvonalon keresztül megy végbe (**38. ábra**).



**38. ábra. A GM-CSF receptor β internalizációja, intracelluláris eloszlása és a receptor indukálta jelátvitel az EMT és a MET során a mesothel sejtekben.** A gyulladás okozta EMT során a GM-CSF receptor β caveolák közreműködésével internalizálódik a mesothel sejtekben. A gyulladás korai időpontjaiban a GM-CSFR β korai endoszómákba szállítódik, ahol az EMT-hez szükséges jelátviteli folyamatok végbemennek. A korai endoszómák fizikai platformot nyújtva biztosítják, hogy az aktivált receptor β továbbítsa a jelátvitelt, és indukálja a JAK2-mediálta STAT5A foszforilációt. A STAT5A aktiválódása után dimereket képezve bejut a sejtmagba, és az EMT specifikus célgének expresszióját szabályozza. Amíg a gyulladás fennáll, jelentős a receptor reciklizációja a plazmamembránra. Majd a gyulladás előrehaladtával, a gyógyulás megindulásával (MET) a receptor egyre inkább késői endoszómákban detektálható, jelezvén, hogy a gyulladás lecsengésével párhuzamosan megindul a GM-CSFR β degradációja. Ha a jelet közvetítő GM-CSF receptor β degradálódik, megindulhat a mesothel sejtek regenerációja (MET) autofágia révén. A SOCS1 - a GM-CSF jelátvitel negatív szabályozója - is jelen van a rendszerben. (A közvetlen szabályozást folyamatos nyilak jelzik, a közvetett szabályozást szaggatott nyilak jelzik. Kékesszürke nyilak mutatják az endocitózis lépéseit, a világoszöld nyilak jelzik a reciklizációs lépéseket, a piros nyilak pedig a degradációs útvonalat jelölik).

Munkánk következő részében a mesothel sejtek regenerációjában szerepet játszó folyamatokat vizsgáltuk. Korábbi morfológiai és morfometriai vizsgálataink azt mutatták, hogy a gyulladás alatt a hámsejtek térfogata, sejtalkotóik száma drasztikusan megnő, a gyógyulás beindulásával viszont fokozatosan csökken (36). A folyamat végeredményeként, a Freund adjuváns injektálását követő 11. napra a mesothel sejtek visszanyerik eredeti, laphám sejtekre jellemző méretüket és morfológiájukat (36). Ezen folyamat során jelentős számú autofág sejtalkotót figyeltünk meg a mesothel sejtekben. Arra kerestük tehát a választ, hogy az autofágia szerepet játszik-e a mesothel sejtek regenerációjában.

Az autofágia kontrollálja és segíti a sejtek saját organelleumainak, komponenseinek lebontását (80, 145), kulcsszerepet játszik a szövetek újjáépítésében, a celluláris homeosztázis fenntartásában (79), a gyulladásos folyamatokban, az immunitásban és a sejtes stresszválasz kialakításában is (80–82). Előzetes morfológiai és morfometriai eredményeink azt mutatták, hogy a gyulladást követő regeneráció során az eredeti laphám fenotípus visszaállításában (MET), a progresszív autofágia nagy jelentőséggel bír a szükségtelen sejtalkotók és citoplazmatikus komponensek, fehérjék eltávolításával. Munkám célja tehát az autofágia molekuláris hátterének részletes feltérképezése volt. Immuncitokémiai és Western blot vizsgálatokkal követtük nyomon az autofágia szabályozásában közvetve és közvetlenül szerepet játszó faktorok, a Beclin-1, LC3B, Akt/p-Akt, mTOR/p-mTOR expresszióját a gyulladás és a gyógyulás különböző időpontjaiban. Az autofagoszómák érése többlépcsős folyamat, amelyben komolyan részt vesznek az endocitotikus útvonal sejtorganelleumai, a korai és a késői endoszómák is (86, 87, 91, 92). Ennek fényében vizsgáltuk azt is, hogy az autofág sejtalkotók számának drasztikus növekedése együtt jár-e ezen endocitotikus sejtorganelleumok számának növekedésével. A kérdés megválaszolására immuncitokémiai és biokémiai vizsgálatokat végeztünk a korai (EEA1) és késői (Rab7) endoszómák jellegzetes markereivel. Általánosan elfogadott tény, hogy a Rab7 nem csupán egy késői endoszómális marker, hanem fontos szerepet játszik az endoszómák/lizoszómák és az autofág sejtorganelleumok közötti fúziós események szabályozásában is (119, 120).

Eredményeink azt igazolták, hogy az EEA1 és a Rab7 is jelentős mennyiségben expresszálódik a mesothel sejtekben mind az EMT, mind a MET során, jelezvén, hogy a

korai és késői endoszómák is nagy mennyiségben vannak jelen a sejtekben, és így biztosítani tudják az intenzív autofágia folyamatát.

A Beclin-1 a csak BH3 domént (Bcl-2 homologia domén) tartalmazó, úgynevezett BH3-only fehérjék csoportjába tartozik, és számos feladattal bír a sejtek életében. Részt vesz a programozott sejtülélesi folyamatokban és az apoptózis regulálásában is. Mint az élesztők Atg6 fehérjéjének emlős megfelelője, egyik kitüntetett funkciója azonban az autofágia szabályozása. A lipid kináz Vps34 fehérje komplex (Beclin-1-Vps34-Vps15) tagjaként, ugyanis kulcsszerepet játszik az autofágia indukálásában a kezdeti nukleációs és elongációs lépések elősegítésével (114). Mindezek alapján a Beclin-1 gyakran használt marker az autofágia tanulmányozása során. Immunocitokémiai és Western blot vizsgálataink azt mutatták, hogy a gyulladás korai stádiumában (3. nap) a Beclin-1 expressziója szignifikánsan megemelkedett, jelentős volt még az 5. napon is, majd a 8. naptól kezdve fokozatosan csökkent. Ezek az eredmények összhangban vannak korábbi morfometriai megfigyeléseinkkel, mivel a Beclin-1 expressziója követi az autofág vakuólumok számbeli változásait a mesothel sejtekben. Fontos továbbá megjegyezni, hogy egy alap Beclin-1 expresszió, még nem képes autofágiát indukálni (115), valamint számos interakció révén, más kofaktorokkal együtt beleszólhat sok egyéb folyamatba, például az autofagoszómák/endoszómákérésébe is (114).

Az LC3 az élesztő Atg8 fehérje emlős homológja, és az autofágia folyamatában szereplő egyik ubiquitin-szerű protein konjugációs rendszer nélkülözhetetlen eleme. Az Atg12 mellett, az Atg8/LC3 az az ubiquitin-szerű molekula, amely szerepet játszik az autofagoszómák formálásában, biogenezisében (146), éppen ezért igen hasznos markere az autofágiának. Az Atg8/LC3 konjugációs rendszere a citoszolikus formából membrán-kötött formát képez, amely mind a fagofórok, mint az autofagoszómák membránján megtalálható. A citoszolikus Atg8/LC3 (LC3-I) C-terminális végét az Atg4 cisztein proteáz hasítja le, így az hozzáférhetővé válik az Atg7 (E1-szerű aktiváló enzim) és az Atg3 (E2-szerű konjugáló enzim) számára, amelyek a membrán egyik komponenséhez, a foszfatidil-etanolaminhoz konjugálják az Atg8-at/LC3-at, így jön létre a lipidált, membrán-kötött forma (LC3-II) (146, 147). Az anti-LC3B ellenanyaggal végzett biokémiai vizsgálataink eredményei egyértelműen azt mutatták, hogy a membránhoz kötött és a citoszolikus LC3B mennyisége fordítottan változott az idő előrehaladtával:

ahogyan felgyorsult és egyre intenzívebbé vált az autofág lebontás, úgy emelkedett meg a citoszolikus LC3B-I szintje, míg a membrán-kötött, lipidált LC3B-II szintje eleinte csökkent, majd teljesen el is tűnt a kezelés után 8 nappal. Amikor az autofagoszómák lizoszómákkal fuzionálva létrehozzák az autolizoszómákat, belső komponenseik végleg lebomlanak. A folyamat velejárója tehát, hogy az autofagoszómák belső membránjához kötött LC3B-II molekulák is lebontásra kerülnek. Így az LC3B-II mennyiségének változása, lizoszómális „turnovere” jól tükrözi az autofágia intenzitását a sejtekben (116–118).

Általánosan elfogadott tény, hogy míg a III. osztályba tartozó foszfatidil-inozitol-3 kináz a Beclin-1-el és más Atg fehérjékkel együtt egy autofágiát elősegítő, proautofág komplexet formál, addig a jól ismert I. osztályú PI3K az Akt-mTOR útvonal aktiválásán keresztül gátolja az autofágiát, ezért igen fontos szerepet játszik az autofág folyamatok negatív szabályozásában (112, 148). A szerin/treonin protein kináz Akt vagy másnéven PKB (protein kináz B), mint a PI3K downstream effektora, különböző extracelluláris jelek, például növekedési faktorok és citokinek hatására számos sejtleletani folyamatot képes befolyásolni (149, 150). Az Akt aktiválódása az aktivációs hurokban lévő 308-as treonin (Thr308), és a C-terminális hidrofób motívumban helyet foglaló 473-as szerin (Ser473) foszforilációját jelenti. Irodalmi adatok szerint a Thr308 foszforilációs mintázata sokkal jobban modellezi az Akt kináz aktivitását, mint a Ser473 (151), ezért mi is ezt vizsgáltuk. Az mTOR, amely szintén egy szerin/treonin kináz, két különböző komplexet is létre tud hozni a sejtekben, az mTOR komplex 1-et (mTORC1) és az mTOR komplex 2-t (mTORC2) (152, 153). Aktivációja szempontjából az mTOR molekulában három foszforilációs hely (S2448, S2481 és T2446) van hatással a későbbi szignalizációs eseményekre (154). Ezek közül az S2448 foszforilációját az Akt mediálja, ezért munkánk során mi ezt a formát tanulmányoztuk. A PI3K-Akt jelátviteli tengely központi downstream komplexe az az mTORC1, amely az extra- és intracelluláris jeleket integrálva, az egyik legfőbb szabályozója a növekedést, a proliferációt, az anyagcserét és a túlélést irányító folyamatoknak (152). Mindezen felül az autofágia egyik fő regulátora is, mivel aktiválódását az energia, az oxigén szintje, a növekedési faktorok és a tápanyagok befolyásolják a sejtekben (152, 153). Ha ugyanis tápanyagok (vagy energia) nem állnak rendelkezésre a sejt számára, a sejtalkotók és

fehérjék autofágián keresztül történő lebontása elegendő biológiai anyagot biztosít az anabolikus folyamatok (fehérjeszintézis és az energiatermelés) fenntartásához (152).

Az mTORC1, - továbbiakban csak mTOR – gátlása, inaktiválása fokozza az autofágiát; míg aktiválása, foszforilációja féken tartja és gátolja az autofág folyamatokat (152, 155). Fontos azonban megjegyezni, hogy egy alap mTOR aktivitás szükséges a sejtek túléléséhez (115). Munkánk során mind immuncitokémiai, mind Western blot vizsgálatok segítségével igazoltuk, hogy a progresszív gyulladás ideje alatt az aktív p-Akt és p-mTOR jelentős mértékben expresszálódott a mesothel sejtekben, így az intenzív autofágiát meg tudták fékezni. Mivel az Akt upstream regulátora az mTOR-nak, így érthető, hogy aktiválódása is korábban következett be, mint az mTOR fehérjének. A gyulladás 3. napján, amikor a foszforilált Akt szintje elérte a maximumot, a p-mTOR szintje is jelentősen megnőtt, majd követve a szignalizáció dinamikáját, fokozódott egészen az 5. napig. Ezt követően, a gyulladás csúcspontja után, amikor a p-Akt, és ennek következtében a p-mTOR aktivitása is lecsengett, expressziójuk drasztikusan lecsökkent, az autofág vakuólumok száma pedig szignifikánsan nőtt; jelezvén, hogy a negatív regulátorok inaktiválásával az autofágia felszabadult a gátlás alól, és beindulhatott az intenzív autofág lebontás.

Mindezek után felmerült az a kérdés, hogy melyek azok a faktorok, amelyek együttesen szabályozzák, szinkronizálják az EMT, a MET és az autofágia folyamatát a mi rendszerünkben. Jól ismert, hogy a PI3K-Akt útvonalat növekedési faktorok és citokinek is aktiválhatják (149, 150). Korábbi munkák során sikerült kimutatni, hogy a Freund adjuváns által kiváltott gyulladás során a TGF- $\beta$  expressziója jelentősen megnőtt a hasüregben (9, 96). Mára már általánosan elfogadott, hogy a kanonikus Smad2/3 útvonal aktiválásával a TGF- $\beta$  az EMT egyik fő szabályozója (45), azonban számos más jelátviteli útvonal segítségével, közvetett módon is képes hatását kifejteni, például, az mTORC2 komplexen keresztül aktiválni tudja a PI3K-Akt-mTOR útvonalat (156, 157). A TGF- $\beta$ -nak tehát kettős hatása van: plazmamembrán receptorain keresztül indukálja az EMT folyamatát, ugyanakkor közvetett úton, a PI3K-Akt útvonal aktiválásával gátolhatja az autofágiát is a mesothel sejtekben (36). Ha azonban caveolákkal internalizálódnak a TGF- $\beta$  receptorok - a gátló Smad7 expressziója révén - (96, 158), a jelátvitel megszakad, és a TGF- $\beta$  EMT-t indukáló hatása megszűnik.



Számos irodalmi adat bizonyítja, hogy az autofágia szabályozása nagyon komplex folyamat, amelyben sok tényező játszik szerepet. Tekintettel arra, hogy munkánk során a GM-CSF hatását tanulmányoztuk, összefüggést kerestünk a GM-CSF expressziója, jelátvitel és az autofágia-mediált regeneráció között a mesothel sejtekben. Jól ismert, hogy a GM-CSF nem csupán a STAT útvonalat aktiválja, hanem a JAK2 downstream effektorán keresztül számos más jelátviteli mechanizmust is képes beindítani (72). Az autofágia szempontjából talán a legfontosabb, hogy a JAK2 foszforilálhatja a PI3K szabályozó alegységét, amely stimulálja kináz működését. Ez az aktiváció pedig az Akt-mTOR útvonal indukálásához vezet (73), amely azt jelenti, hogy a GM-CSF - a TGF- $\beta$ -hoz hasonlóan -, receptora jelenlétében, a PI3K-Akt-mTOR útvonal aktiválásán keresztül szabályozza az autofágia folyamatát. Irodalmi adatok vannak már arra vonatkozóan is, hogy a GM-CSF az mTOR jelátvitel aktiválásán keresztül indukálja a makrofággá történő differenciációt, és ezzel együtt gátolja az autofágiát (159). Ha azonban a GM-CSF receptor  $\beta$  az internalizáció után a lizoszómákban degradálódik, a downstream elemek inaktiválódnak, a gyulladás lecseng, így az autofágia - felszabadulva a gátlás alól - felgyorsul, és elősegíti a mesothel sejtek regenerációját.

A következő kérdés az volt, hogy milyen környezetből érkező, extracelluláris vagy intracelluláris, esetleg a mesothel sejtek által termelt szignál segíti a regenerációt az autofágia mellett, és fordítja vissza az EMT folyamatát. Irodalmi adatokból ismert, hogy míg a TGF- $\beta$  az EMT induktora, addig a BMP fehérjék leginkább MET-et idéznek elő (56, 57, 121, 122). Ezért munkánk következő lépésében azt vizsgáltuk, hogy a BMP fehérjék szerepet játszanak-e a mesothel sejtek regenerációjában (MET). Számos kísérlet és irodalmi adat támasztja alá, hogy a BMP7 az egyik leghatékonyabb induktora a MET-nek, és gátlója az EMT-nek (121, 122, 160). Az azonban kevésbé ismert, hogy a BMP4 is képes MET-et indukálni (161), sőt, e két faktor heterodimerje (BMP4/7) például jóval hatékonyabban működik embrionálisan, a mesoderma indukciója során, mint homodimerjeik (162). Ennek fényében immuncitokémiai és biokémiai módszerekkel tanulmányoztuk, hogy a mesothel sejtekben termelődik-e BMP4 és BMP7, és expresszálják-e a BMP ligand specifikus II-es típusú receptort. Western blot vizsgálataink során kapott eredményeink azt mutatták, hogy a Freund adjuváns injektálását követő 3. napon már jelentős mennyiségben expresszálódott a BMP4 a

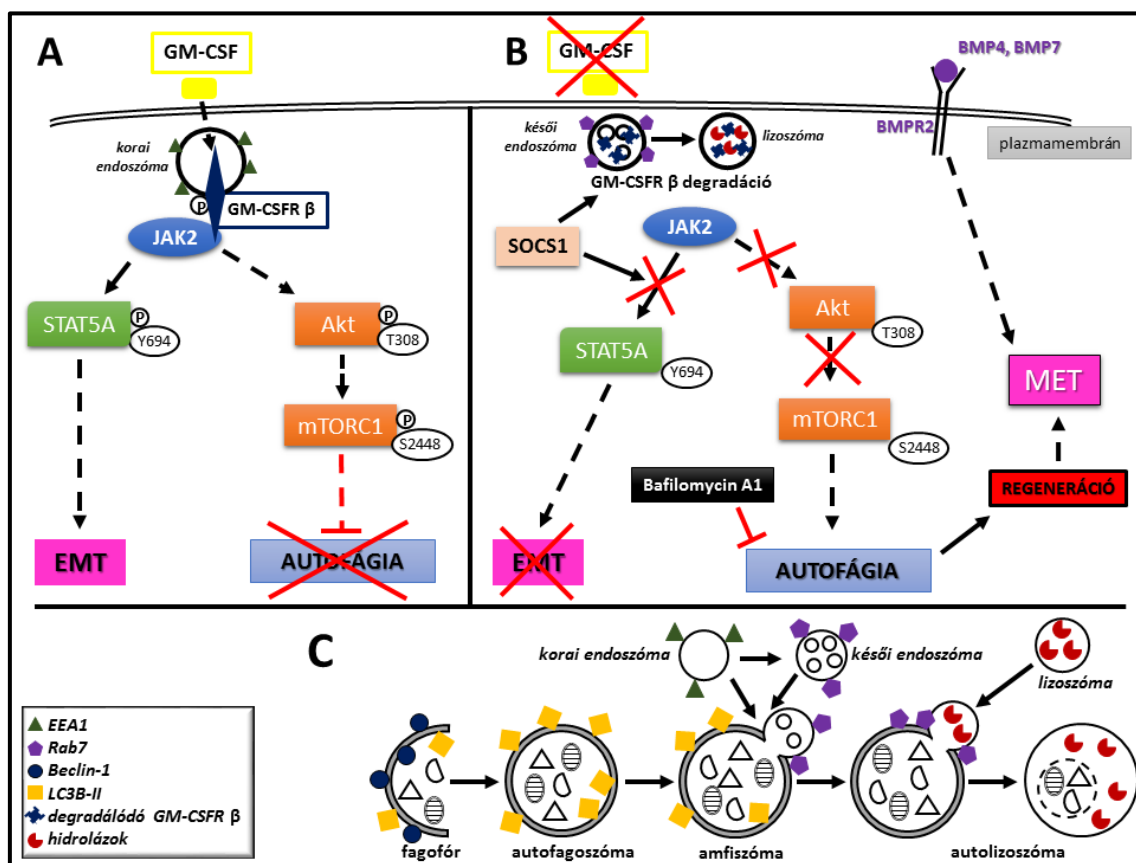
mesothel sejtekben, expressziója az 5. napon érte el maximumát. Ezt követően, a gyógyulás beindulásával mennyisége kissé ugyan csökkent, de a mesothel sejtek még a 11. napon is expresszálták. A BMP7 ezzel szemben olyan kevés mennyiségben expresszáldott a mesothel sejtekben (3. és 5. nap), hogy biokémiai módszerrel nem is volt detektálható. Ezért megnéztük, hogy a peritoneális mosófolyadékban kimutatható-e a BMP7, a MET egyik legfontosabb induktora. Western blot vizsgálataink során már a kontroll mintában is detektálható mennyiségben volt jelen BMP7. Szintje fokozatosan nőtt a Freund adjuváns indukálta gyulladás során (3. és 5. nap), majd a gyulladás 8. napján, amikor a mesothel sejtek regenerációja elkezdődött, elérte maximumát.

Az aktív BMP ligandok egyszeres transzmembrán doménnel rendelkező szerin/treonin kináz receptorokon (BMPRI és BMPRII) keresztül indukálnak jelátviteli utakat (50). Ezen receptoroknak számos altípusa létezik, amelyek közül munkánk során azzal a II-es típusú receptorral (BMPRII) dolgoztunk, amelyről ismert, hogy specifikusan csak BMP típusú ligandumot tud kötni (51, 53). Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a kontroll mesothel sejtek csekély mennyiségben expresszálták a BMPRII-t, majd a Freund adjuváns kezelést követően expressziója fokozatosan nőtt egészen a regeneráció végéig, a 11. napig. Vizsgálataink eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a mesothel sejtek már a gyulladás korai stádiumában termelik a BMP4-et, és expresszálják az azt megkötni képes BMPRII-t, jelezvén, hogy a sejtek egy auto/parakrin szabályozás révén valószínűsíthetően már ekkor próbálják kompenzálni a progresszív EMT-t indukáló faktorok (TGF- $\beta$ , GM-CSF, stb.) hatását. Vizsgálataink során az is egyértelműen kiderült, hogy a mesothel sejtek nem, vagy csak alig detektálható mennyiségben termelik a BMP7-et, de mivel a hasüri folyadékban ez a fehérje nagy mennyiségben kimutatható, feltételezzük, hogy más kötőszöveti sejtek termelik és szekretálják a hasüregbe, a gyulladásos folyamat előrehaladtával egyre nagyobb mértékben. A mesothel sejteken a BMPRII expressziója hasonlóan növekvő tendenciát mutat. Mindezek alapján arra következtethetünk, hogy az EMT-t indukáló faktorok lecsengése, és az egyre nagyobb mennyiségben expresszáldó BMP7 valamint BMPRII jelenléte a MET folyamata felé billenti a mérleg nyelvét, így segíti a mesothel sejtek regenerációját.

Végezetül annak bizonyítására, hogy az autofágia valóban kulcs szerepet játszik a mesothel sejtek gyógyulásában, és eredeti laphám morfológiájuk visszaállításában,

vizsgáltuk az autofágiát gátló bafilomycin A1 jelenlétében a regeneráció folyamatát. A bafilomycin A1 az egyik leggyakrabban használt, és igen jól bevált gátlószere az autofágiának. Képes megakadályozni az autofagoszómák és lizoszómák közti fúziót, valamint gátolja az endoszómák, lizoszómák savasodását is, amellyel felborítja az autofág flux dinamikáját (163–165). *In vivo* kísérleteinkben bafilomycin A1 intraperitoneális injektálásával akadályoztuk meg tehát az autofág lebontást, és morfológia vizsgálatokkal követtük nyomon az autofágia és a regeneráció folyamatát a bafilomycines kezelések után. Mind fény-, mind pedig elektronmikroszkópos felvételeinken jól látható, hogy a bafilomycin kezelés (2 és 4 óra) önmagában nincs hatással a mesothel sejtek morfológiájára, és a sejtek ultrastruktúrája teljesen hasonlít a kezeletlen hashártya mesothel sejtjeiéhez. A Freund adjuváns kezelést is kapott állatok hashártyájának mesothel sejtjein azonban bafilomycin kezelés hatására drasztikus morfológiai és szerkezeti változások figyelhetők meg. A Freund adjuváns injektálását követő 3. és 5. napon vizsgált, bafilomycin kezelést is kapott állatok mesothel sejtjeinek összehasonlítása során szignifikáns különbségeket nem találtunk, de az idő előrehaladtával a mesothel sejtek egyre jobban és nagyobb mértékben mutatták az apoptózisra jellemző, jellegzetes morfológiai elváltozásokat (166). A sejtek vakuolizáltságának mértéke fokozódott, egyre több és nagyobb citoplazma maradvány hasítódott le róluk, a sejtmag kromatinjának kondenzációja is egyre markánsabb volt. 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 gátlásának következtében apoptózis útján elpusztulnak. A regeneráció jeleit még csak nyomokban sem lehetett megfigyelni egyik vizsgálati csoportban sem. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a mesothel sejtek jelentősen veszítettek méretükből, zsugorodtak, a bleb képződés jelei egyértelműen látszódtak, a citoplazma vakuolizáltságának mértéke súlyosbodott. A sejtek citoplazmájában a szekretetüket vesztett sejtorganellumokon kívül csak a le nem bontott törmelék denz maradványa volt megfigyelhető. Érett, lebontást végző, savas autolizoszómát még csak nyomokban sem tudtunk felfedezni bennük. Sejtmagjukban a magvacska szétesett, a kromatin marginális kondenzációja pedig igen látványos volt. A négy, bafilomycinnel kezelt, és a gyulladás 8. napján vizsgált állatcsoport közül a legsúlyosabb morfológiai elváltozásokat abban a két csoportban találtunk, amelyek 4 napon keresztül, illetve az 5.

és a 6. napokon kapták a bafilomycin A1 kezelést; abban az időintervallumban, amikor az autofágia éppen felszabadult volna a különböző jelátviteli útvonalak, és az inhibitor molekulák gátlása alól, és az intenzív lebontási folyamat beindulhatott volna. Eredményeink alapján egyértelműen megállapíthatjuk, hogy az autofágia nélkülözhetetlen, kulcsfontosságú szerepet játszik a gyulladás utáni regenerációban (MET), gátlásával pedig a gyulladásban lévő mesothel sejtek apoptózis útján elpusztulnak (39. ábra).



**39. ábra.** Az EMT és az autofágia inverz szabályozása a mesothel sejtekben. (A): A gyulladás ideje alatt - a GM-CSF ligand jelenlétében - a GM-CSF receptor  $\beta$  internalizációja aktiválja a JAK2-STAT5 útvonalat, amely indukálja a mesothel sejtek mesenchymális/makrofág átalakulását (EMT). A JAK2 alternatív útvonalakat is képes elindítani, például az Akt-mTOR jelátvitelt, amely gátolja az autofág folyamatokat.

**(B):** A GM-CSF hiánya, illetve az endocitózissal felvett receptor  $\beta$  degradációja - a SOCS1 közreműködésével - a downstream elemek (JAK2, STAT5) inaktiválásához és a jelátviteli mechanizmus leállításához vezet, amelynek eredményeként lecsengenek az EMT-t indukáló hatások. Az alternatív útvonalak sem aktiválódnak, az Akt-mTOR útvonal is gátlódik, az autofágia pedig - felszabadulva a negatív regulálás alól - elindul, és segíti a mesothel sejtek regenerációját. Ezt a folyamatot a BMP4 és BMP7 is segíti, MET-et indukáló hatásukat a BMPR2-n keresztül fejtik ki. Ha azonban bafilomycin A1 kezeléssel gátoljuk az autofág lebontást, a mesothel sejtek apoptózis útján elpusztulnak.

**(C):** Az autofágia lépései az iniciációtól a degradációig, és az endocitotikus organellek közreműködése a folyamatban. (A közvetlen szabályozást folyamatos nyilak jelzik, a közvetett szabályozást szaggatott nyilak mutatják).

## 7. Következtetések

- ❖ Kísérleteim során bizonyítottam, hogy a patkány hashártya mesothel sejtei expresszálják a GM-CSF jelátvitelben szereplő, szignál transzdukcióért felelős GM-CSF receptor  $\beta$  alegységét. Expressziója a gyulladás alatt szignifikánsan megnő.
- ❖ A GM-CSF receptor  $\beta$  alegységének internalizációja elengedhetetlen feltétele a jelátviteli folyamatok beindulásának. A mesothel sejtekben a GM-CSF receptor  $\beta$  internalizációja caveolák közreműködésével, caveolin-mediált endocitózis útján történik, és a klasszikus korai-késői endoszóma, lizoszóma útvonalat követi.
- ❖ A caveolák közreműködésével felvett GM-CSF receptor  $\beta$  a gyulladás előrehaladtával (3. napon) korai endoszómákba kerül. A korai endoszómák szolgáltatják a fizikai platformot a jelátviteli partnerek találkozásához, lehetővé téve a JAK2-mediált STAT5 tirozinon való foszforilációját. A GM-CSF receptor  $\beta$  dinamin-függő endocitózisának blokkolása gátolja a STAT5 foszforilációját, így a jelátvitelt is. Mindez pedig megkérdőjelezhetetlen bizonyítéka annak, hogy a receptor  $\beta$  internalizációja nélkül a jelátviteli folyamatok nem aktiválódnak és nem mennek végbe.
- ❖ Amíg a gyulladás fennáll, jelentős a GM-CSF receptor  $\beta$  reciklizációja a plazmamembránba, jelezvén, hogy a receptor egy újabb endocitotikus ciklusban vesz részt, így képes fenntartani az EMT-t indukáló jelátviteli mechanizmusokat.
- ❖ A gyulladás lecsengésével és a gyógyulás megindulásával a GM-CSF receptor  $\beta$  késői endoszómákban detektálható, amely - a lizoszómákkal való fúzió után - lebomlik. Ha a jelet közvetítő receptor  $\beta$  degradálódik, megindulhat a mesothel sejtek regenerációja (MET).
- ❖ Gyulladásos stimulus hatására a STAT5A és STAT5B transzkripció aktivitását segítő, szerinen foszforilált formája a mesothel sejtekben végig jelentős mértékben expresszálódik a Freund adjuváns kezelést követően. Nem ismert azonban, hogy mi a biológiai jelentősége ezen formák expressziójának.
- ❖ Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a GM-CSF jelátvitel negatív visszacsatolását és leállítását végző SOCS1 regulátor fehérje a mesothel sejtekben is expresszálódik.

- ❖ Igazoltuk, hogy a mesothel sejtek regenerációja autofágiával megy végbe. A progresszív autofágia folyamata együtt jár az endocitotikus sejtorganellek számának növekedésével. A Rab7 fokozódó expressziója segíteni tudja az endocitotikus és autofág sejtalkotók fúzióját.
- ❖ Az autofágia folyamatában közvetlen szerepet játszó Beclin-1 és LC3B expressziója az autofágia dinamikájának megfelelően változik. Az LC3B membránhoz kötött formájának mennyisége jelentősen csökken az autofágia progresszív beindulásával, jelezvén, hogy a membrán-kötött forma az intenzív autofág lebontás áldozata lesz.
- ❖ 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 feleslegessé vált sejtalkotók és fehérjék intenzív lebontása, amely segíti a mesothel sejtek regenerációját.
- ❖ A GM-CSF receptor  $\beta$  lizoszómális degradációja fontos lépés az intenzív autofágia megindításához.
- ❖ A mesothel sejtek gyógyulását (MET) a BMP faktorok is elősegítik. A mesothel sejtek már a gyulladás korai időpontjában expresszálják a BMP4-et. A BMP4 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 bafilomicin A1 gátolja az autofagoszómák és lizoszómák közti fúziót, valamint az endoszómák és lizoszómák savasodását, így módon blokkolja az autofágia folyamatát. Ha a gyulladás során az állatokat bafilomicin A1-gyel kezeljük, a mesothel sejtek nem regenerálódnak, hanem apoptózissal elpusztulnak; egyértelműen igazolva, hogy az autofágia nélkülözhetetlen a mesothel sejtek gyulladás utáni regenerációjában (MET).

## 8. Összefoglalás

Korábbi kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a Freund adjuváns indukálta gyulladás a patkányok hashártyájának mesothel sejtjeiben epitheliális-mesenchymális átalakulást (EMT II) idéz elő, amelynek során a sejtek makrofág-szerű sejtekké differenciálódnak. Korábbi *in vitro* vizsgálataink igazolták, hogy a TGF- $\beta$  és/vagy GM-CSF kezelés hasonló fenotípusos átalakulást indukál a mesothel sejtekben (67, 97). Előzetes eredményeink azt sugallták, hogy ezen átalakulás lejátszódásához a ligandot kötő GM-CSF receptor internalizációja szükséges.

Jelen munkában immuncitokémiai, biokémiai és statisztikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a gyulladás során a szignál transzdukcióért felelős GM-CSF receptor  $\beta$  caveolin-mediált endocitózissal internalizálódik, majd korai endoszómákba kerül, ahol végbemegy a JAK2-mediált STAT5A tirozin-foszforilációja, és az aktiválódott transzkripciós faktor bejut a sejtmagba. Ha azonban a GM-CSFR  $\beta$  dinamin-függő endocitózist dynasore kezeléssel gátoljuk, a STAT5A nem foszforilálódik, igazolva, hogy a receptor  $\beta$  internalizációja nélkül a jelátvitel nem megy végbe. A gyulladás korai időpontjaiban a GM-CSFR  $\beta$  reciklizáló endoszómákkal visszajut a plazmamembránba, fenntartva ezáltal az EMT folyamatát. A regeneráció megindulásával, - a SOCS1 közreműködésével - a receptor  $\beta$  késői endoszómákba kerül, és a lizoszómális degradáció útján lebomlik.

A gyulladás alatt a mesothel sejtek térfogata, sejtalkotóik száma drasztikusan megnő, majd a gyógyulás beindulásával csökken, amikor nagyszámú autofág struktúra jelenik meg a citoplazmában (36). Immuncitokémiai és Western blot vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a gyulladás ideje alatt az Akt-mTOR útvonal aktiválódik, amely gátolja az autofágiát. A gyógyulás beindulásakor azonban, - a jelátvitelt aktiváló receptorok lebontásával - ezen gátló faktorok inaktiválódnak, az autofágia felszabadul a gátlás alól, megindul a feleslegessé vált sejtalkotók, fehérjék intenzív lebontása, és a mesothel sejtek visszanyerik eredeti hám fenotípusukat (36). A regenerációban (MET) fontos szerepet játszanak a BMP4 és BMP7 faktorok is. Kísérleteink, amelyek során az autofágiát bafilomycin A1 kezeléssel gátoltuk, egyértelműen igazolják, hogy az autofágia kulcs szerepet játszik a gyulladást követő regenerációban.



## 9. Summary

In our previous work we proved, that Freund's adjuvant induced inflammation causes epithelial-mesenchymal transition (EMT II) in rat mesenteric mesothelial cells, whereupon the cells are differentiated into macrophage-like cells. Our previous *in vitro* experiments showed, that TGF- $\beta$  and/or GM-CSF treatment induces similar phenotypic changes in mesothelial cells (67, 97). Our preliminary results suggested, that the internalization of ligand-binding GM-CSF receptor is necessary for this transition.

Our recent immunocytochemical, biochemical and statistical analyses proved, that during inflammation the signal transducer GM-CSF receptor  $\beta$  is internalized by caveolin-mediated endocytosis, then it is delivered into early endosomes, where JAK2-mediated tyrosine-phosphorylation of STAT5A occurs, and the activated transcription factor is translocated into the nucleus. When the dynamin-dependent endocytosis of GM-CSFR  $\beta$  is inhibited by dynasore treatment, STAT5A phosphorylation is not occurred, confirming, that the internalization of receptor  $\beta$  is essential for signal transduction. In the early time of inflammation, GM-CSFR  $\beta$  returns back to the plasma membrane by recycling endosomes, maintaining the EMT. As the regeneration starts, receptor  $\beta$  - with the contribution of SOCS1 - is delivered into late endosomes, and it is degraded by lysosomes.

The volume of mesothelial cells, the number of the cellular organelles is dramatically increased during inflammation, but when the recovery starts, their number is started to decrease, and a large number of autophagic structures appear in the cytoplasm (36). Our immunocytochemical and Western blot experiments confirmed, that during inflammation, the Akt-mTOR pathway is activated, arresting autophagy. As the regeneration starts, signal transducer receptors are degraded, the inhibitory factors are inactivated, and the elimination of unnecessary organelles, proteins starts by autophagy, thus mesothelial cells regain their original epithelial phenotype (36). BMP4 and BMP7 factors also play important role in the regeneration (MET). Our experiments, when autophagy was inhibited by bafilomycin A1, clearly prove, that the autophagy plays essential role in the regeneration following inflammation.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Mutsaers SE. (2002) Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7: 171–191.
2. Mutsaers SE. (2004) The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 9–16.
3. Mutsaers SE, Prêle CM, Pengelly S, Herrick SE. (2016) Mesothelial cells and peritoneal homeostasis. *Fertil Steril*, 106: 1018–1024.
4. Whitaker D, Papadimitriou JM, Walters MN. (1982) The mesothelium and its reactions: a review. *Crit Rev Toxicol*, 10: 81–144.
5. Thomas NW. Embryology and Structure of the Mesothelium. In: Jones J.S.P. (eds) *Pathology of the Mesothelium*. Springer, London, 1987: 1–2.
6. Michailova K, Wassilev W, Wedel T. (1999) Scanning and transmission electron microscopic study of visceral and parietal peritoneal regions in the rat. *Ann Anat*, 181: 253–260.
7. Kiss AL, Botos E. (2009) Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med*, 13: 1228–1237.
8. Kiss AL. (2012) Caveolae and the regulation of endocytosis. *Adv Exp Med Biol*, 729: 14–28.
9. Balogh P, Szabó A, Katz S, Likó I, Patócs A, Kiss AL. (2013) Estrogen receptor alpha is expressed in mesenteric mesothelial cells and is internalized in caveolae upon Freund's adjuvant treatment. *PLoS One*, 8: e79508. doi: 10.1371/journal.pone.0079508.
10. Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. (1996) Changes in the concentration of microvilli on the free surface of healing mesothelium are associated with alterations in surface membrane charge. *J Pathol*, 180: 333–339.
11. Madison LD, Bergstrom-Porter B, Torres AR, Shelton E. (1979) Regulation of surface topography of mouse peritoneal cells. Formation of microvilli and

- vesiculated pits on omental mesothelial cells by serum and other proteins. *J Cell Biol*, 82: 783-797.
12. Mutsaers SE, Birnie K, Lansley S, Herrick SE, Lim CB, Prêle CM. (2015) Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front Pharmacol*, 6: 113. doi: 10.3389/fphar.2015.00113.
  13. Li C, Ren Y, Jia X, Liang P, Lou W, He L, Li M, Sun S, Wang H. (2012) Twist overexpression promoted epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells under high glucose. *Nephrol Dial Transplant*, 27: 4119–4124.
  14. Kalluri R, Weinberg RA. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119: 1420–1428.
  15. Kalluri R, Neilson EG. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 112: 1776–1784.
  16. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. (2005) Regulation of the polarity protein Par6 by TGF $\beta$  receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, 307: 1603-1609.
  17. Smith A, Teknos TN, Pan Q. (2013) Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 49: 287–292.
  18. Forte E, Chimenti I, Rosa P, Angelini F, Pagano F, Calogero A, Giacomello A, Messina E. (2017) EMT/MET at the Crossroad of Stemness, Regeneration and Oncogenesis: The Ying-Yang Equilibrium Recapitulated in Cell Spheroids. *Cancers (Basel)*, 9. doi: 10.3390/cancers9080098.
  19. Greenburg G, Hay ED. (1982) Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, 95: 333–339.
  20. Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. (2007) Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*, 213: 374–383.

21. Stone RC, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon KI, Tomic-Canic M. (2016) Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res*, 365: 495–506.
22. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. (2010) A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7: 51–63.
23. Yao D, Dai C, Peng S. (2011) Mechanism of the mesenchymal–epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res*, 9: 1608–1620.
24. Škovierová H, Okajčeková T, Strnádel J, Vidomanová E, Halašová E. (2018) Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review). *Int J Mol Med*, 41: 1187–1200.
25. Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S. (2015) EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med*, 4: 6. doi: 10.1186/s40169-015-0048-3.
26. Santamaria PG, Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. (2017) EMT: Present and future in clinical oncology. *Mol Oncol*, 11: 718–738.
27. Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. (2012) Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*, 125: 1795–1808.
28. Lamouille S, Xu J, Derynck R. (2014) Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15: 178–196.
29. Banyard J, Bielenberg DR. (2015) The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*, 56: 403–413.
30. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. (2010) Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15: 117–134.

31. Fletcher SJ, Poulter NS, Haining EJ, Rappoport JZ. (2012) Clathrin-mediated endocytosis regulates occludin, and not focal adhesion, distribution during epithelial wound healing. *Biol Cell*, 104: 238–256.
32. Itallie CM, Anderson JM. (2012) Caveolin binds independently to claudin-2 and occludin. *Ann N Y Acad Sci*, 1257: 103–107.
33. Birchmeier W. (2005) Cell adhesion and signal transduction in cancer. Conference on cadherins, catenins and cancer. *EMBO Rep*, 6: 413–417.
34. Santibanez JF, Obradović H, Kukulj T, Krstić J. (2018) Transforming growth factor- $\beta$ , matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. *Dev Dyn*, 247: 382–395.
35. Hotulainen P, Lappalainen P. (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 173: 383–394.
36. Zsiros V, Katz S, Dóczi 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.
37. Thiery JP, Huang R. (2005) Linking epithelial-mesenchymal transition to the well-known polarity protein Par6. *Dev Cell*, 8: 456–458.
38. Lee JK, Joo KM, Lee J, Yoon Y, Nam DH. (2014) Targeting the epithelial to mesenchymal transition in glioblastoma: the emerging role of MET signaling. *Onco Targets Ther*, 7: 1933–1944.
39. Yang J, Liu Y. (2002) Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 13: 96–107.
40. Neilson EG. (2006) Mechanisms of disease: Fibroblasts--a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2: 101–108.
41. Katz S, Balogh P, Nagy N, Kiss AL. (2012) Epithelial-to-mesenchymal transition induced by Freund's adjuvant treatment in rat mesothelial cells: a morphological

- and immunocytochemical study. *Pathol Oncol Res*, 18: 641–649.
42. Massagué J. (2012) TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13: 616–630.
  43. Kim JH, MacLaughlin DT, Donahoe PK. (2014) Müllerian inhibiting substance/anti-Müllerian hormone: A novel treatment for gynecologic tumors. *Obstet Gynecol Sci*, 57: 343–357.
  44. Shi Y, Massagué J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113: 685-700.
  45. Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP. (2009) Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol*, 5: 1145–1168.
  46. Huang F, Chen YG. (2012) Regulation of TGF- $\beta$  receptor activity. *Cell Biosci*, 2: 9. doi: 10.1186/2045-3701-2-9.
  47. Kang JS, Liu C, Derynck R. (2009) New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol*, 19: 385–394.
  48. Macias MJ, Martin-Malpartida P, Massagué J. (2015) Structural determinants of Smad function in TGF- $\beta$  signaling. *Trends Biochem Sci*, 40: 296–308.
  49. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. (2017) Stromal Modulators of TGF- $\beta$  in Cancer. *J Clin Med*, 6. doi: 10.3390/jcm6010007.
  50. von Bubnoff A, Cho KW. (2001) Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, 239: 1-14.
  51. Chen D, Zhao M, Mundy GR. (2004) Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22: 233–241.
  52. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242: 1528–1534.
  53. Ye L, Jiang WG. (2016) Bone morphogenetic proteins in tumour associated angiogenesis and implication in cancer therapies. *Cancer Lett*, 380: 586–597.

54. Na YR, Seok SH, Kim DJ, Han JH, Kim TH, Jung H, Lee BH, Park JH. (2009) Bone morphogenetic protein 7 induces mesenchymal-to-epithelial transition in melanoma cells, leading to inhibition of metastasis. *Cancer Sci*, 100: 2218–2225.
55. Mege RM, Matsuzaki F, Gallin WJ, Goldberg JI, Cunningham BA, Edelman GM. (1988) Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 7274–7278.
56. Tan EJ, Olsson AK, Moustakas A. (2015) Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGF $\beta$ . *Cell Adh Migr*, 9: 233–246.
57. Bosukonda A, Carlson WD. (2017) Harnessing the BMP signaling pathway to control the formation of cancer stem cells by effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Soc Trans*, 45: 223–228.
58. Metcalf D. (2010) The colony-stimulating factors and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10: 425–434.
59. Bradley TR, Metcalf D. (1966) The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 44: 287–299.
60. Ichikawa Y, Pluznik DH, Sachs L. (1966) In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 56: 488–495.
61. Trudgett A, McNeill TA, Killen M. (1973) Granulocyte-macrophage precursor cell and colony-stimulating factor responses of mice infected with *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 8: 450-455.
62. Stanley ER, Heard PM. (1977) Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem*, 252: 4305-4312.
63. Metcalf D. (2013) The colony-stimulating factors and cancer. *Cancer Immunol Res*, 1: 351–356.
64. Shi Y, Liu CH, Roberts AI, Das J, Xu G, Ren G, Zhang Y, Zhang L, Yuan ZR, Tan HS, Das G, Devadas S. (2006) Granulocyte-macrophage colony-stimulating

- factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res*, 16: 126–133.
65. Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J, Hernandez-Pando R. (2014) Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol*, 31: 774. doi: 10.1007/s12032-013-0774-6.
  66. Griffin JD, Cannistra SA, Sullivan R, Demetri GD, Ernst TJ, Kanakura Y. (1990) The biology of GM-CSF: regulation of production and interaction with its receptor. *Int J Cell Cloning*, 8: 35–45.
  67. Katz S, Zsiros V, Dóczi 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.
  68. Root RK, Dale DC. (1999) Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: comparisons and potential for use in the treatment of infections in nonneutropenic patients. *J Infect Dis*, 179: S342-352.
  69. Kaufman HL, Ruby CE, Hughes T, Slingluff CL Jr. (2014) Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer*, 2: 11. doi: 10.1186/2051-1426-2-11.
  70. Becher B, Tugues S, Greter M. (2016) GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity*, 45: 963–973.
  71. Hansen G, Hercus TR, McClure BJ, Stomski FC, Dottore M, Powell J, Ramshaw H, Woodcock JM, Xu Y, Guthridge M, McKinstry WJ, Lopez AF, Parker MW. (2008) The structure of the GM-CSF receptor complex reveals a distinct mode of cytokine receptor activation. *Cell*, 134: 496–507.
  72. Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, Lopez AF. (2009) The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*, 114: 1289–1298.



73. van de Laar L, Coffey PJ, Woltman AM. (2012) Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood*, 119: 3383–3393.
74. Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z. (2009) Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297: F244-256.
75. Yang Z, Klionsky DJ. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12: 814-822.
76. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24: 24–41.
77. Parzych KR, Klionsky DJ. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*, 20: 460–473.
78. Mizushima N. (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, 12: 1535–1541.
79. Mizushima N, Komatsu M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147: 728–741.
80. Kroemer G, Mariño G, Levine B. (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40: 280–293.
81. Choi AJ, Ryter SW. (2011) Autophagy in inflammatory diseases. *Int J Cell Biol*, 2011: 732798. doi: 10.1155/2011/732798.
82. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 469: 323–335.
83. Shibutani ST, Yoshimori T. (2014) A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 24: 58–68.
84. Carlsson SR, Simonsen A. (2015) Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci*, 128: 193–205.
85. Tooze J, Hollinshead M, Ludwig T, Howell K, Hoflack B, Kern H. (1990) In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the

- autophagic pathway immediately after the early endosome. *J Cell Biol*, 111: 329–345.
86. Berg TO, Fengsrud M, Strømhaug PE, Berg T, Seglen PO. (1998) Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. *J Biol Chem*, 273: 21883–21892.
  87. Lucocq J, Walker D. (1997) Evidence for fusion between multilamellar endosomes and autophagosomes in HeLa cells. *Eur J Cell Biol*, 72: 307–313.
  88. Punnonen EL, Autio S, Kaija H, Reunanen H. (1993) Autophagic vacuoles fuse with the prelysosomal compartment in cultured rat fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 61: 54–66.
  89. Klionsky DJ. (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 931–937.
  90. Dunn WA Jr. (1990) Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*, 110: 1935–1945.
  91. Gordon PB, Høyvik H, Seglen PO. (1992) Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *Biochem J*, 283: 361–369.
  92. Lawrence BP, Brown WJ. (1992) Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J Cell Sci*, 102: 515–526.
  93. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, 5: 539–545.
  94. Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192: 245–250.
  95. Yang YP, Hu LF, Zheng HF, Mao CJ, Hu WD, Xiong KP, Wang F, Liu CF. (2013) Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin*, 34: 625–635.
  96. Balogh P, Magyar M, Szabó A, Müllner N, Likó I, Patócs A, Kiss AL. (2015)

- The subcellular compartmentalization of TGF $\beta$ -RII and the dynamics of endosomal formation during the signaling events: An in vivo study on rat mesothelial cells. *Eur J Cell Biol*, 94: 204–213.
97. Katz S, Zsiros V, Dóczi 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.
  98. Katz S. Gyulladás indukálta hám-mesenchyma/mesothel-makrofág átalakulás vizsgálata a hashártya mesothel sejteiben. Doktori értekezés, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2015: 37-83.
  99. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. (2006) Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*, 10: 839–850.
  100. Slot JW, Geuze HJ. (2007) Cryosectioning and immunolabeling. *Nat Protoc*, 2: 2480–2491.
  101. Liou W, Geuze HJ, Slot JW. (1996) Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol*, 106: 41–58.
  102. Hjelle JT, Golinska BT, Waters DC, Steidley KR, McCarroll DR, Dobbie JW. (1989) Isolation and propagation in vitro of peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int*, 9: 341–347.
  103. Olson BJ, Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. 2007: 3.4.1-3.4.29. doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48.
  104. Lopez AF, Hercus TR, Ekert P, Littler DR, Guthridge M, Thomas D, Ramshaw HS, Stomski F, Perugini M, D'Andrea R, Grimbaldeston M, Parker MW. (2010) Molecular basis of cytokine receptor activation. *IUBMB Life*, 62: 509–518.
  105. Pálffy M, Reményi A, Korcsmáros T. (2012) Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends Cell Biol*, 22: 447–456.
  106. Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG, Parton RG. (2000) EEA1, a

- tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 11: 2657–2671.
107. Huotari J, Helenius A. (2011) Endosome maturation. *EMBO J*, 30: 3481–3500.
  108. Goldenring JR. (2015) Recycling endosomes. *Curr Opin Cell Biol*, 35: 117–122.
  109. Darnell JE Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635.
  110. Liao NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, Callaghan K, Nicola NA, Kershaw NJ, Babon JJ. (2018) The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun*, 9: 1558. doi: 10.1038/s41467-018-04013-1.
  111. Fujimoto M, Naka T. (2010) SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterol Res Pract*, 2010: 470468. doi: 10.1155/2010/470468.
  112. Noguchi M, Hirata N, Suizu F. (2014) The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1846: 342–352.
  113. Kim KW, Paul P, Qiao J, Chung DH. (2013) Autophagy mediates paracrine regulation of vascular endothelial cells. *Lab Invest*, 93: 639–645.
  114. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. (2011) The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18: 571–580.
  115. Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D, Denmark T. (2009) A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem*, 284: 21412–21424.
  116. Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 2503–2518.
  117. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. (2005) Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*, 1: 84–91.
  118. Tanida I, Ueno T, Kominami E. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*,

445: 77-88.

119. Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci*, 117: 4837–4848.
120. Hyttinen JM, Niittykoski M, Salminen A, Kaarniranta K. (2013) Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim Biophys Acta*, 1833: 503–510.
121. Bi WR, Xu GT, Lv LX, Yang CQ. (2014) The ratio of transforming growth factor- $\beta$ 1/bone morphogenetic protein-7 in the progression of the epithelial-mesenchymal transition contributes to rat liver fibrosis. *Genet Mol Res*, 13: 1005–1014.
122. Wang Y, Liang D, Zhu Z, Li X, An G, Niu P, Chen L, Tian L. (2016) Bone morphogenetic protein-7 prevented epithelial-mesenchymal transition in RLE-6TN cells. *Toxicol Res (Camb)*, 5: 931–937.
123. Katz S, Balogh P, Kiss AL. (2011) Mesothelial cells can detach from the mesentery and differentiate into macrophage-like cells. *APMIS*, 119: 782–793.
124. Walker F, Burgess AW. (1987) Internalisation and recycling of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on a murine myelomonocytic leukemia. *J Cell Physiol*, 130: 255–261.
125. Okuda K, Druker B, Kanakura Y, Koenigsmann M, Griffin JD. (1991) Internalization of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor is not required for induction of protein tyrosine phosphorylation in human myeloid cells. *Blood*, 78: 1928-1935.
126. Khwaja A, Roberts PJ, Jones HM, Yong K, Jaswon MS, Linch DC. (1990) Isoquinolinesulfonamide protein kinase inhibitors H7 and H8 enhance the effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSE) on neutrophil function and inhibit GM-CSF receptor internalization. *Blood*, 76: 996–1003.
127. Eder M, Ernst TJ, Ganser A, Jubinsky PT, Inhorn R, Hoelzer D, Griffin JD. (1994) A low affinity chimeric human alpha/beta-granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor receptor induces ligand-dependent proliferation in a murine cell line. *J Biol Chem*, 269: 30173–30180.
128. Couet J, Shengwen L, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP. (1997) Molecular and cellular biology of caveolae paradoxes and plasticities. *Trends Cardiovasc Med*, 7: 103–110.
  129. Mayor S, Parton RG, Donaldson JG. (2014) Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6: a016758. doi: 10.1101/cshperspect.a016758.
  130. Parton RG, del Pozo MA. (2013) Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 98–112.
  131. Busija AR, Patel HH, Insel PA. (2017) Caveolins and cavins in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: implications for cell physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312: C459-C477.
  132. Scott CC, Vacca F, Gruenberg J. (2014) Endosome maturation, transport and functions. *Semin Cell Dev Biol*, 31: 2-10.
  133. Mayor S, Pagano RE. (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 603-612.
  134. Pfeffer SR. (2017) Rab GTPases: master regulators that establish the secretory and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*, 28: 712-715.
  135. Novick P, Zerial M. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol*, 9: 496-504.
  136. Talati PG, Gu L, Ellsworth EM, Gironde MA, Trerotola M, Hoang DT, Leiby B, Dagvadorj A, McCue PA, Lallas CD, Trabulsi EJ, Gomella L, Aplin AE, Languino L, Fatatis A, Rui H, Nevalainen MT. (2015) Jak2-Stat5a/b Signaling Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Stem-Like Cell Properties in Prostate Cancer. *Am J Pathol*, 185: 2505-2522.
  137. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. (1999) STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in

- hematopoietic cells. *EMBO J*, 18: 4754-4765.
138. Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr, Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN, Jenkins NA. (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*, 29: 225-228.
  139. Lin JX, Leonard WJ. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, 19: 2566-2576.
  140. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. (1995) Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8831-8835.
  141. Grimley PM, Dong F, Rui H. (1999) Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 10: 131-157.
  142. Krebs DL, Hilton DJ. (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19: 378-387.
  143. Friedbichler K, Kerenyi MA, Kovacic B, Li G, Hoelbl A, Yahiaoui S, Sexl V, Müllner EW, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, Valent P, Beug H, Gouilleux F, Bunting KD, Moriggl R. (2010) Stat5a serine 725 and 779 phosphorylation is a prerequisite for hematopoietic transformation. *Blood*, 116: 1548-1558.
  144. Bunda S, Kommaraju K, Heir P, Ohh M. (2013) SOCS-1 mediates ubiquitylation and degradation of GM-CSF receptor. *PLoS One*, 8: e76370. doi: 10.1371/journal.pone.0076370.
  145. Levine B, Klionsky DJ. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6: 463-477.
  146. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. (2008) The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*, 19: 2092-2100.
  147. Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. (2008) Atg8 controls phagophore expansion during

- autophagosome formation. *Mol Biol Cell*, 19: 3290-3298.
148. Yu X, Long YC, Shen HM. (2015) Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy*, 11: 1711-1728.
  149. Song G, Ouyang G, Bao S. (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, 9: 59-71.
  150. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8: 627-644.
  151. Vincent EE, Elder DJ, Thomas EC, Phillips L, Morgan C, Pawade J, Sohail M, May MT, Hetzel MR, Tavaré JM. (2011) Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 104: 1755-1761.
  152. Laplante M, Sabatini DM. (2009) mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*, 122: 3589-3594.
  153. Kim YC, Guan KL. (2015) mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*, 125: 25-32.
  154. Acosta-Jaquez HA, Keller JA, Foster KG, Ekim B, Soliman GA, Feener EP, Ballif BA, Fingar DC. (2009) Site-specific mTOR phosphorylation promotes mTORC1-mediated signaling and cell growth. *Mol Cell Biol*, 29: 4308-4324.
  155. Codogno P, Meijer AJ. (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12: 1509-1518.
  156. Lamouille S, Connolly E, Smyth JW, Akhurst RJ, Derynck R. (2012) TGF- $\beta$ -induced activation of mTOR complex 2 drives epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *J Cell Sci*, 125: 1259-1273.
  157. Lamouille S, Derynck R. (2007) Cell size and invasion in TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *J Cell Biol*, 178: 437-451.
  158. Balogh P, Katz S, Kiss AL. (2013) The role of endocytic pathways in TGF- $\beta$



- signaling. *Pathol Oncol Res*, 19: 141-148.
159. Zhang M, Liu F, Zhou P, Wang Q, Xu C, Li Y, Bian L, Liu Y, Zhou J, Wang F, Yao Y, Fang Y, Li D. (2019) The MTOR signaling pathway regulates macrophage differentiation from mouse myeloid progenitors by inhibiting autophagy. *Autophagy*, 1-13. doi: 10.1080/15548627.2019.1578040.
  160. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. (2005) Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*, 280: 8094-8100.
  161. Lin L, Liang L, Yang X, Sun H, Li Y, Pei D, Zheng H. (2018) The homeobox transcription factor MSX2 partially mediates the effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on somatic cell reprogramming. *J Biol Chem*, 293: 14905-14915.
  162. Suzuki A, Kaneko E, Maeda J, Ueno N. (1997) Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun*, 232: 153-156.
  163. Mauvezin C, Neufeld TP. (2015) Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11: 1437-1438.
  164. Redmann M, Benavides GA, Berryhill TF, Wani WY, Ouyang X, Johnson MS, Ravi S, Barnes S, Darley-Usmar VM, Zhang J. (2017) Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol*, 11: 73-81.
  165. Orsini M, Morceau F, Dicato M, Diederich M. (2018) Autophagy as a pharmacological target in hematopoiesis and hematological disorders. *Biochem Pharmacol*, 152: 347-361.
  166. Elmore S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

### Az értekezés alapjául szolgáló, a disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- ❖ **Zsiros V**, Katz S, Dóczi 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**, Dóczi 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**, Dóczi 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

### 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

## 12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik tudásukkal, tanácsaikkal, támogatásukkal, megértésükkel és szeretetükkel segítettek PhD tanulmányaimat, munkámat és doktori értekezésem elkészítését.

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. L. Kiss Annának, hogy megannyi időt fordított megbeszéléseinkre, támogatta ötleteimet, hasznos tanácsaival, szakmai tapasztalatával, gondos odafigyelésével segítette munkámat, egyengette pályámat.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Szél Ágostonnak, hogy az Intézet minden támogatást megadott számomra a munka elvégzéséhez, illetve hálásan köszönöm Prof. Dr. Röhlich Pálnak a cikkek bírálatával kapcsolatosan megfogalmazott értékes kritikai megjegyzéseket, és hogy figyelemmel kísérte munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Katz Sándornak a közös munkát, a sok biztatást, a bátorítást és a szakmai tanácsokat.

Szeretnék köszönetet mondani Dóczy Nikolett és Lőcsey Katalin asszisztenseknek a technikai segítségükért és az értékes labormunkájukért. Hálával tartozom továbbá Dr. Puskár Zitának, Dr. Szabó Arnoldnak, Dobozi Évának és Balázs Tamás Lászlónak, hogy szakmai tanácsaikkal segítettek a konfokális mikroszkópia és a biokémiai vizsgálatok elsajátításában és alkalmazásában, valamint a módszertani tudás elmélyítésében.

Köszönettel tartozom barátaimnak, akik az elmúlt évek során bölcs tanácsaikkal, kedves szavaikkal segítettek munkámat és mindennapjaimat.

Örök hálával tartozom családomnak, mindenekelőtt Édesanyámnak és Nagymamámnak, akik végtelen szeretetükkel, önzetlen áldozathozatalaikkal végig segítettek a tanulmányaim során. Odaadó gondoskodásukkal, támogatásukkal biztos hátteret nyújtottak, segítettek a nehéz időkben is, és végig mellettem álltak.