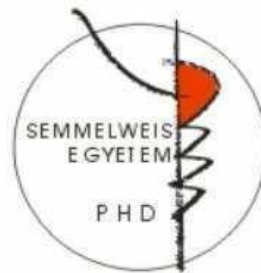


Mintázat felismerő receptorok szerepe a nem alkoholos zsírmáj pathogenezisében

Doktori tézisek

Dr. Csák Tímea

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Gyöngyi, egyetemi tanár, PhD

Hivatalos bírálók: Dr Pár Gabriella, egyetemi adjunktus, PhD
Dr Werling Klára, egyetemi docens, PhD

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Banai János, egyetemi tanár, CSc
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Herszényi László, egyetemi docens, PhD
Dr. Székely György, o.vez.főorvos, CSc

Budapest
2012

1. BEVEZETÉS

Nem alkoholos zsírmáj (NAFLD=non-alcoholic fatty liver disease) az egyik leggyakoribb májbetegség, ami a nyugati lakosság több, mint 1/3-át érinti. A betegség az egyszerű steatosistól, az előrehaladottabb steatohepatitis-en (NASH=non-alcoholic steatohepatitis) át fibrosis és cirrhosis kialakulásához vezethet. A NASH pathogenezeise nem teljesen tisztázott. Az utóbbi években számos vizsgálat felvetette a természetes immunitás szerepét a NASH kialakulásában. A mintázat felismerő receptorok közé tartozó Toll-like receptorok (TLR) és NOD-like receptorok (NLR) a természetes immunitás fontos elemei, és a mikrobiális komponenseken túl szerepet játszanak a sérült sejtekből felszabaduló, endogén “veszély” molekulák felismerésében is. A mintázat felismerő receptorok közvetítésével kiváltott gyulladás hozzájárul számos betegség pathogenezéséhez.

A zsírmáj kifejezetten érzékeny a TLR4-ligand lipopolysaccharid (LPS vagy endotoxin) iránt, ami a Gram-negatív baktériumok alkotóeleme. Emelkedett plazma endotoxin szintet írtak le NASH betegekben és steatohepatitis állatkísérletes modelljeiben is. A TLR4-MD2 receptor komplex NASH pathogenezésében betöltött szerepe azonban nem teljesen tisztázott.

Az inflammaszóma, egy nagy, multiprotein, caspase-1 aktiváló komplex, ami a NOD-like receptorok közvetítésével gyulladás kialakulásához vezet. A NALP3 inflammaszóma számos “veszély” molekula felismerésében szerepet játszik, aktiválása a gyulladásos citokin interleukin-1 β (IL-1 β) hasítását és aktiválását eredményezi. Az inflammaszóma aktiváció egy két lépcsős folyamat, melyben első lépésként általában egy TLR ligand, mint pl. az LPS, fokozza az inflammaszóma expresszióját, míg egy második ligand aktiválja az inflammaszómát. Az inflammaszóma sejtspecifikus eloszlása és szerepe a májban nem ismert.

A NASH pathogenezésében és progressziójában szerepet játszó faktorok mellett kihívást jelent a steatohepatitis és vírusfertőzések, mint pl. hepatitis C vírus vagy HIV együttes előfordulása. A fenti kórképek jelentősen rontják egymás prognózisát. A steatohepatitisben megfigyelt csökkent antivirális immunitás pathomechanizmusa még tisztázásra vár.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja a természetes immunválasz szerepének vizsgálata volt a nem alkoholos zsírmáj pathogenezisében.

2/1. A munka első részében a Gram-negatív baktériumok fali alkotóelemének, az endotoxinnak illetve az endotoxin receptorának, a Toll-like receptor 4 (TLR4)-nek a NASH pathogenezisében betöltött szerepét vizsgáltuk. A kísérletek kivitelezéséhez methionin és cholin mentes diétával létrehozott zsírmáj modellt alkalmaztunk vad típusú valamint TLR4 illetve MD2 (myeloid differenciációs faktor 2) hiányos egereken. MD2 az endotoxint érzékelő TLR4 receptor komplex része.

2/2. A munka második részének a célja egy gyulladásozó citokin, az interleukin-1 β , illetve az IL-1 β aktiválásáért felelős intracelluláris multiprotein komplex, az inflammaszóma szerepének vizsgálata volt a NASH kialakulásában. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Van-e kimutatható inflammaszóma aktiváció és fokozott IL-1 β termelés nem alkoholos zsírmájban illetve nem alkoholos steatohepatitisben?
- Amennyiben van inflammaszóma aktiváció, mely sejteket érinti a májban? A májsejtek expresszálják-e az inflammaszómát és előfordul-e inflammaszóma aktiváció a hepatocitákban?
- Mi aktiválhatja az inflammaszómát nem alkoholos steatohepatitisben?
- Hozzájárul-e az inflammaszóma aktiváció a NASH kialakulásához? A kérdés megválaszolásához methionin és cholin mentes diéta által létrehozott zsírmáj modellt alkalmaztunk vad típusú valamint ASC (inflammaszóma adaptor), caspasase-1 (inflammaszóma effektor) és IL-1 receptor hiányos egereken.
- Kimutatható-e az inflammaszóma fokozott expressziója NASH betegek májbiopsziás mintájában?

2/3. A munka harmadik részének a célja az antivirális immunitás vizsgálata volt nem alkoholos steatohepatitisben. Arra kerestük a választ, hogy vajon azok az egerek, amelyekben NASH-t hoztunk létre methionin és cholin hiányos diétával,

fogékonyabbak-e a vírus indukálta májkárosodásra. Továbbá vizsgálatunk célja volt a kiváltott antivirális válasz részletes tanulmányozása. A vírusfertőzést szintetikus dupla szálú RNS (Poly I:C) intraperitoneális injekciójával imitáltuk.

MÓDSZEREK

Állatkísérletek

Minden állatkísérletet a University of Massachusetts (UMASS) Medical School Állatkísérleti Bizottságának (IACUC=Institutional Animal Use and Care Committee) engedélyével és előírásai szerint végeztünk.

Vad típusú, C57Bl/6 egereket methionin és cholin mentes (MCD=methionine-choline deficient) diétával etettünk 5 ill. 8 hétig, valamint az egerek egy másik csoportja magas zsírtartalmú (HFD=high fat diet) diétát kapott 4 hétig vagy 9 hónapig. A kontroll egerek vagy az MCD-diétának megfelelő, de DL-methionint és cholin bitartrátot tartalmazó (MCS=methionine-choline supplemented) diétát, vagy normal rágcsáló diétát kaptak. Ezen felül leptin-hiányos (ob/ob; B6.V-Lep ob/J) egereket is alkalmaztunk a megfelelő kontrollcsoporttal. Az állatok egy-egy csoportja 2 vagy 6 órával a leölés előtt TLR4 ligand lipopolysaccharidot (LPS), TLR3/RLR ligand szintetikus dupla szálú RNS-t (Poly I:C=polyinosinic:polycytidylic acid), vagy TLR9 ligand CpG oligonucleotidot kapott intraperitoneális injekció formájában. A következő génkiütött (knock-out) egétörzseket használtuk: TLR4-, MD2 (myeloid differenciációs factor 2), ASC (apoptosis associated speck like CARD-domain containing protein), caspase-1 és IL-1 receptor hiányos egerek.

Biokémiai és citokin méréseket (szérum alanin aminotranszferáz, szérum citokinek [TNF α , IL-6, IL-1 β , IFN β , HMGB1], máj trigliceridek és thiobarbiturát reaktív anyagok); **szövetani vizsgálatokat** (hematoxylin-eosin, picro-sirius red, OilRed O festés, F4/80 és α -simaizom aktin immunohisztokémia) végeztünk. RNS-t és fehérjét (teljes sejt, mitokondriális és citoplazma fehérjék) izoláltunk májszövetből, amelyet valós idejű PCR reakcióhoz illetve Western blot analízishez (SDS-PAGE- és native gél

elektroforézis, valamint immunprecipitáció) használtunk. A következő funkcionális vizsgálatokat alkalmaztuk: caspase-1, -3, NADPH aktivitás és sejttotoxicitás vizsgálat.

In vitro kísérletek

Májsejteket és máj eredetű mononukleáris immunsejteket izoláltunk egerekből, továbbá egér hepatoma sejtvonalat (Hepa1-6) és egér monocita-makrofág sejtvonalat (RAW 264.7) használtunk in vitro kísérleteinkhez. A sejteket LPS-el, szaturált és nem szaturált zsírsavakkal (palmitát, oleát, linolénsav) illetve azok kombinációjával kezeltük. A sejtek egy része pan-caspase inhibitorral (ZVAD) volt előkezelve. A dupla szálú RNS-t (Poly I:C-t) Lipofectamin 2000 segítségével jutattuk be a májsejtekbe. A máj eredetű mononukleáris immunsejtek intracelluláris TNF α és ED1 (CD68) expresszióját flow citometriával vizsgáltuk.

Humán májbiopsziás minták vizsgálata

A vizsgálatok az 1975-ös Helsink Deklarátumnak megfelelően, a University of Massachusetts humán vizsgálatokért felelős tudományos etikai tanácsának engedélyével, valamint minden résztvevő írásos beleegyezésével történtek.

Hat, klinikailag és szövettanilag bizonyított NASH beteg májbiopsziás mintáját vizsgáltuk. Normál humán máj RNS-t (*OriGene Technologies*) használtunk kontrollként, valamint az eredményeket krónikus hepatitis C fertőzött betegek (n=5) májbiopsziás mintájával hasonlítottuk össze.

EREDMÉNYEK

A Toll-like receptor 4 (TLR4) és myeloid differenciációs faktor-2 (MD2) hiánya részlegesen kivédi a nem alkoholos steatohepatitis és fibrózis kialakulását egerekben

A TLR4-MD2 receptor komplex expressziójának hiánya részlegesen kivédi az MCD diéta indukálta steatosist és gyulladást a májban

A TLR4-MD2 receptor komplex alapvető a bakteriális endotoxin felismerésében és korábban számos kutatócsoport kimutatta, hogy a TLR4 receptor mediált gyulladásoz kaszkád fontos szerepet játszik az alkoholos hepatitis pathogenezisében. Mivel a nem alkoholos steatohepatitisben látott szövettani és pathofiziológiai elváltozások nagymértékben hasonlítanak az alkoholos steatohepatitisre, munkánk során a TLR4-MD2 receptor NASH kialakulásában betöltött szerepét kívántuk feltérképezni. Methionin és cholin hiányos diéta a korábban leírtaknak megfelelően hepatikus steatosist és gyulladás kialakulásához vezetett vad típusú egerekben. Mind a máj zsírtartalma, mind a gyulladásoz sejtinfiltráció szignifikánsan alacsonyabb volt a TLR4 és MD2 knock-out egerekben 8 hét MCD diéta után a vad típusú kontroll állatokhoz képest. Az előbbit a máj csökkent triglicerid tartalma, az utóbbit mind az F4/80+, és a CD68+ TNF α termelő makrofágok csökkent száma, mind az alacsonyabb szérumban TNF α szint mutatta. Az enyhébb fokú gyulladásnak megfelelően az MCD diéta szignifikánsan kisebb májkárosodáshoz vezetett a TLR4 és MD2 knock-out egerekben a vad típusúakhoz képest, amit az alacsonyabb szérumban alanin aminotranszferáz (ALT) adatok mutattak.

A TLR4-MD2 receptor komplex expressziójának hiánya csökkenti az oxidatív stresszt

Az oxidatív stressz és lipid peroxidáció fontos elemei a NASH pathogenezisének. A methionin-cholin hiányos diéta fokozott lipid peroxidációhoz vezetett a májban az MCS kontroll csoporthoz képest a májszövet tiobarbiturát reaktív anyagainak mérése alapján. A hipotézisünknek megfelelően, miszerint a TLR4-MD2 receptor komplex szerepet játszik a NASH kialakulásában, szignifikánsan alacsonyabb lipid peroxidációt találtunk mind a TLR4, mind a MD2 knock-out egerekben a vad típusú kontrollhoz képest.

A NADPH oxidáz komplex az egyik fő forrása a reaktív oxigéngyököknek. Mind a NADPH oxidáz komplex alkotóelemeinek (p47phox, p67phox, gp91phox, p22phox) expressziója, mind a komplex funkcionális aktivitása magasabb volt nem alkoholos steatohepatitisben a vad típusú egerekben az MCS kontroll csoporthoz képest. A TLR4 ill. MD2 hiánya szignifikánsan csökkentette a NADPH oxidáz komplex expresszióját és aktivitását a vad típusú állatokhoz képest NASH-ben. A fenti adatok azt sugallják, hogy

a TLR4-MD2 receptor komplex NADPH oxidáz függő reaktív oxigéngyökök és fokozott lipidperoxidáció révén játszhat szerepet a NASH pathogenezisében.

A TLR4-MD2 receptor komplex expressziójának hiánya részlegesen kivédi az MCD diéta által indukált májfibrózist

A NASH kutatás egyik kulcseleme a betegség progressziójának, a fibrózis és cirrhosis kialakulásának a vizsgálata. Az MCD diéta 8 hét alatt a hepatikus csillagsejtek aktiválódásához és májfibrózis kialakulásához vezet egerekben, amit estünkben az alpha simaizom aktin (α SMA) immunohisztokémia, a sirius red festés, valamint a fibrózissal társuló gének (α SMA, kollagén, TGF β) fokozott expressziója mutatott. A TLR4 és MD2 expresszió hiánya szignifikánsan csökkentette a NASH-hez társult fibrózis kialakulását a vad típusú egerekhez képest. A májfibrózis kialakulását a mátrix metalloproteázok (MMP) és azok specifikus inhibitorai szabályozzák. Mind a mátrix metalloproteáz-2 (MMP2), mind a szöveti matrix metalloproteáz inhibitor-1 (TIMP1) expressziója emelkedett volt az MCD diétával etetett egerek májában az MCS kontroll csoportéhoz képest. Ezt a fokozott expressziót a TLR4 ill. MD2 gének hiánya kivédte.

Zsírsvak és bakteriális eredetű endotoxin inflammaszóma aktivációhoz vezetnek nem alkoholos steatohepatitisben

Mint a fenti adatok mutatják, az endotoxin (LPS) és receptora, a TLR4 fontos szerepet tölt be a NASH pathogenezisében. A Toll-like receptorok és NOD-like receptorok jelátviteli útjai között számos kapcsolódási pont van. A TLR4 ligand LPS kritikus szerepet játszik az inflammaszóma komplex aktivációjában a pro-IL-1 β és maga az inflammaszóma komplex expressziójának fokozásával. Az inflammaszóma egy intracelluláris multiprotein komplex, mely a NOD-like receptorok közvetítésével caspase-1 aktivációhoz és ezáltal többek között IL-1 β szekrécióhoz vezet. Következő lépésként így az inflammaszóma szerepét vizsgáltuk a NASH kialakulásában.

Az MCD diéta-indukálta steatohepatitis inflammaszóma aktivációval és fokozott IL-1 β termeléssel társul a májban

A NASH-ben megfigyelhető gyulladásnak megfelelően emelkedett szérum és máj IL-1 β protein ill. mRNS szinteket találtunk MCD diéta indukálta steatohepatitisben az MCS kontroll csoporthoz képest. Ezzel összhangban, a pro-IL-1 β hasítását és ezáltal aktiválását végző NALP3 inflammaszóma komplex (NALP3, ASC, pro-caspase-1) expressziója magasabb volt az MCD diétával etetett csoportban a kontrollhoz képest. A NALP3 az ASC adaptor molekula segítségével komplexet képez a pro-caspase-1-el, ami az enzim autoaktivációjához vezet és az aktív caspase-1 hasítja és ezáltal aktiválja a pro-IL-1 β -t. Fokozott hepatikus caspase-1 aktivitást találtunk MCD diéta indukálta steatohepatitisben a kontrollhoz képest és ez magasabb aktív (17kDa) IL-1 β szinttel társult.

A magas zsírtartalmú diéta hosszú távú etetésével kiváltott steatohepatitis inflammaszóma aktivációval társul a májban, míg a rövid távon kialakult steatosisban nem figyelhető meg inflammaszóma aktiváció

A magas zsírtartalmú diéta kezdetben “egyszerű” steatosist okoz, és csupán hosszabb távon vezet gyulladás, steatohepatitis kialakulásához. Ennek megfelelően a 4 hetes HFD etetést követően kialakult zsírmájban sem gyulladásra utaló TNF α emelkedést, sem inflammaszóma aktivációt nem detektáltunk. Ezzel szemben a 9 hónapos HF diéta steatohepatitis kialakulásához vezetett magasabb TNF α szintekkel a kontroll csoporthoz képest. Továbbá, a NALP3 inflammaszóma komplex magasabb expresszióját és aktivitását találtuk emelkedett IL-1 β fehérje szintekkel a kontrollhoz képest. A leptin hiánya egerekben szintén zsírmáj kialakulásához vezet szignifikáns gyulladás nélkül. Ez utóbbi csoportban ugyancsak nem tudtunk inflammaszóma aktivációt kimutatni.

Magasabb hepatikus inflammaszóma expresszió NASH betegekben

Magasabb NALP3, pro-caspase-1, ASC és pannexin-1 expressziót mértünk NASH betegek májbiopsziás mintáiban mRNS szinten az egészséges kontrollokhoz képest. Ugyan az inflammaszóma expresszió fokozott volt krónikus hepatitis C-s betegekben is, de jóval kisebb mértékben, mint a NASH csoportban.

Az LPS az inflammaszóma fokozott expressziójához vezet

In vivo LPS stimuláció az inflammaszóma komplex fokozott expressziójához, és magasabb IL-1 β fehérje szintekhez vezetett mind az MCD és a kontroll diétával etetett csoportban, azonban az LPS indukálta inflammaszóma expresszió szignifikánsan magasabb steatohepatitisben a kontrollhoz képest.

Fokozott inflammaszóma expresszió a májsejtekben NASH-ben

Következő kérdésként arra kerestük a választ, hogy az inflammaszóma aktiváció mely sejteket érinti a májban. A mai napig az inflammaszóma kutatás nagy része immunsejteken történt. Az MCD diéta szignifikánsan magasabb NALP3, ASC, pro-caspase-1, pannexin-1 é pro-IL-1 β expresszióhoz vezetett a májsejtekben, míg a máj mononukleáris immunsejtekben (LMNC=liver mononuclear cell) nem találtunk különbséget az inflammaszóma expresszióban a kezelt és a kontroll csoport között.

In vitro zsírsavak és LPS inflammaszóma aktivációt okoznak a májsejtekben

Mind a zsírsavak, mind az endotoxin (LPS) fontos szerepet játszanak a NASH pathogenezisében. Emelkedett szérum endotoxin szintet mértünk MCD-diéta indukálta steatohepatitisben. A szaturált zsírsav, palmitát, fokozott NALP3 inflammaszóma expresszióhoz vezetett izolált májsejtekben, csakúgy, mint Hepa 1-6 és RAW makrofág sejtvonalakon. LPS *in vitro* alkalmazása úgyszintén növelte a NALP3 mRNS szinteket a májsejtekben. Azonban az LPS önmagában nem indukált inflammaszóma aktivációt és IL-1 β szekréciót és a palmitát is alacsony IL-1 β szintekhez vezetett kimutatható caspase-1 aktiváció nélkül. Ezzel szemben LPS stimuláció a plamitáttal előkezelt hepatocitákban mind caspase-1 aktivációt, mind szignifikánsan magasabb IL-1 β szekréció eredményezett, ami a zsírsavak hatásának kitett májsetek szenzitizációját sugallja. Eredményeink azt is mutatják, hogy az inflammaszóma aktivációhoz két szignál szükséges májsejtek esetén. A palmitát-indukált IL-1 β szekréció caspase-1 aktiváció nélkül alternatív IL-1 β hasító mechanizmusok keresésére ösztönzött. Korábban több munkacsoport kimutatta, hogy a caspase-8 is képes az IL-1 β -t hasítani és aktiválni. Fokozott caspase-8 aktivációt találtunk a palmitáttal kezelt májsejtekben, amit azonban a palmitát és LPS kombinációja nem fokozott tovább. Ezek alapján arra

következtethettünk, hogy a caspase-8 szerepet játszhat a palmitát-indukálta IL-1 β szekrécióban hepatocitákban.

A palmitáttal kezelt májsejtek “veszély” molekulákat szabadítanak fel, melyek inflammaszóma aktivációhoz vezetnek a mononukleáris immunsejtekben

Caspase-8 az apoptózis kaszkád része. A magasabb LDH szintek a palmitáttal kezelt hepatociták felülúszójában a sejtek károsodására utalt. A palmitát-indukálta apoptózis kivédése pan-caspase inhibitorral (ZVAD), kivédte a NALP3 és IL-1 β mRNS fokozott expresszióját is, azt suggalva, hogy nem a palmitát maga, hanem a palmitát indukálta apoptózis során generált “veszély” molekulák felelősek az inflammaszóma fokozott expressziójáért. Továbbá, a fenti “veszély” molekulák inflammaszóma aktivációhoz vezettek a mononukleáris immunsejtekben is. Palmitáttal kezelt, majd a palmitát eltávolítása után további 12 órán át inkubált májsejtek felülúszója inflammaszóma expressziót eredményezett a LMNC-ekben, ami szintén ZVAD-függő volt.

Az inflammaszóma hiánya nem védi ki az MCD diéta indukálta steatohepatitist

Következő lépésként az inflammaszóma aktiváció fiziológiás jelentőségét vizsgáltuk a NASH kialakulásában knock-out egértörzsek alkalmazásával. Sem az inflammaszóma adaptor molekulájának, az ASC-nak, sem a caspase-1-nek a hiánya nem védte ki az MCD diéta indukálta májkárosodást, amit a magas ALT értékek mutattak mind a kontroll, mind a knock-out csoportokban. Az ASC hiánya nem befolyásolta a zsírmáj kialakulását sem, és egyformán magasabb IL-1 β szinteket mérünk az MCD diétával etetett ASC-hiányos és kontroll egerek májában. Továbbá, magasabb caspase-1 aktivitás volt detektálható az ASC knock-out egerekben is MCD diéta után az MCS kontrollhoz képest, azt suggalva, hogy olyan inflammaszóma komplex is szerepet játszhat a NASH pathogeneziséen, amely nem igényeli az ASC adaptor molekulát (pl. NALP1).

Az effektor caspase-1 molekula hiánya sem befolyásolta az aktív IL-1 β szinteket a májban felvetve az alternatív IL-1 β hasítás lehetőségét. Mint fentebb említettük, a caspase-8 is képes az IL-1 β hasítására. Ennek megfelelően magasabb caspase-8 aktivitást taláunk az MCD diéta indukálta steatohepatitisban mind a vad típusú, mind az ASC ill. caspase-1 knock-out egerekben. Ez arra engedett következtetni, hogy a caspase-8 kompenzálhatja a caspase-1 hiányát az IL-1 β aktiválásában NASH-ben.

Az IL-1 receptor hiánya enyhíti az MCD diéta indukálta steatosist, de nem védi ki sem a májkárosodást, sem a fibrózist a májban

Tovább vizsgálva az IL-1 β NASH-ben betöltött szerepét, IL-1 receptor knock-out egereket alkalmaztunk. Az IL-1 receptor hiánya csökkentette a zsírfelhalmozódást a májban a vad típusú kontrollhoz képest NASH-ben. Ezzel szemben, sem a májkárosodás méteke, amit az ALT értékek mutattak, sem az MCD diéta indukálta májfibrózis nem csökkent az IL-1R knock-out egerekben a vad típusú kontrollhoz képest. Utóbbi a kollagén mRNS szintek és a sirius red festés, valamint az alpha-simaizom aktin immunohisztokémia mutatta.

A mitokondriális antivirális jelátviteli fehérje (MAVS=mitochondrial antiviral signaling protein) defektusa csökkent antivirális válaszhoz és fokozott vírus-indukálta májkárosodáshoz vezet steatohepatitisben

Csökkent 1-es típusú interferon termelés steatohepatitisben poly I:C stimulációt követően

A szintetikus dupla szálú RNS (dsRNS), poly I:C, széles körben használt vírus fertőzések helyettesítésére. A dsRNS-t felismerő TLR3 ill. helikáz receptorok jelátviteli útjai jelentős 1-es típusú interferon (IFN) termeléshez vezetnek. MCD diéta indukálta steatohepatitisben szignifikánsan alacsonyabb 1-es típusú IFN termelést találtunk az MCS kontroll csoporthoz képest. Mind a szérumban IFN β és májban IFN β ill. $\alpha 4$ protein ill. mRNS szintek, mind az 1-es típusú IFN indukálta gének (ISG56, ISG15) hepaticus expressziója alacsonyabb volt MCD-steatohepatitisben a kontrollhoz képest poly I:C stimulációt követően.

A csökkent 1-es típusú IFN-termelés csak a RIG-I/Mda-5 receptor-függő jelátviteli utat érinti

A csökkent IFN termeléshez vezető jelátviteli utak feltételezéséhez 1-es típusú IFN termelést indukáltunk a dsRNS-től eltérő módon. A dsRNS-t felismerő TLR3 receptor a TRIF adaptor molekulát használja, míg a szintén dsRNS felismerő helikáz receptorok (RIG-I/Mda-5) adaptor molekulája a MAVS. A TLR4 ligand LPS szintén a TRIF molekulát használja a MyD88 mellett, míg a TLR9-ligand a MyD88 közvetítésével vezet IFN termeléshez. Az a tény, hogy az 1-es típusú IFN termelés defektusa csak a dsRNS által kiváltott jelátviteli utakat érintette steatohepatitisben, arra engedett következtetni, hogy a defektus a helikáz receptorok szintjén van a TLR3/TRIF jelátviteli rendszertől függetlenül.

A helikáz adaptor MAVS fehérje defektusa nem alkoholos steatohepatitisben

Az adaptor molekula MAVS kritikus a helikáz receptorok jelátvitelében, defektusa csökkent 1-es típusú IFN és gyulladáscsökkentő citokin termeléshez vezet az IRF3 ill. NF κ B transzkripciós faktorok csökkent működése révén. A csökkent 1-es típusú IFN termelésnek megfelelően alacsonyabb MAVS fehérje szinteket találtunk MCD-steatohepatitisben a májban a kontrollhoz képest. A magasabb MAVS mRNS szintek ellenére mért alacsonyabb fehérje szintek többek között fokozott degradációra utaltak. A proteozómális PSMA7 mRNS expressziója magasabb volt NASH-ben a kontrollhoz képest. PSMA7 a MAVS fokozott proteozómális lebontásához vezet. MCD-steatohepatitisben fokozott asszociációt mutattunk ki a PSMA7 és MAVS között a kontrollhoz képest immunprecipitáció segítségével. Az alacsonyabb MAVS expresszió mellett, a MAVS mitokondriális lokalizációja és oligomerizációja is érintett volt MCD-steatohepatitisben, a MAVS transzlokációját figyeltük meg a mitokondriumról a citoplazmába, és alacsonyabb MAVS oligomer/monomer arányt találtunk a kontrollhoz képest. Mind a lokalizáció, mind az oligomerizáció fontos a jelátviteli kaszkádkhoz. Ennek megfelelően poly I:C stimuláció alacsonyabb IRF3 aktivációhoz (foszforilált IRF3) vezetett.

Mitokondriális károsodás NASH-ben

A mitokondriális károsodás előfordulása régóta ismert NASH-ben. Valóban, magasabb citokróm C szinteket mértünk MCD-steatohepatitisben a májban a kontrollhoz képest, ami mitokondriális károsodásra utalt. A mitokondriális károsodás oka és eredménye is lehet a fokozott reaktív oxigéngyök termelés. Magasabb hepatikus TBAR szinteket mértünk MCD-steatohepatitisben a kontrollhoz képest, ami tovább emelkedett poly I:C stimulációt követően. Ez fokozott lipid peroxidációra és oxidatív stresszre utalt. A mitokondriális károsodás részben felelős lehet a MAVS fehérje csökkent mitokondriális lokalizációjáért. Emellett fokozott caspase-8 és -1 aktivitást találtunk a MCD diétával etetett csoportban. Korábban mindkét enzimről kimutatták, hogy képesek hasítani és így inaktiválni a MAVS fehérjét.

PolyI:C fokozott májkárosodást okoz steatohepatitisben a gyulladáscitokin TNF α excesszív termelése nélkül

Poly I:C stimuláció szignifikánsan magasabb szérumban ALT szintekhez vezetett MCD-steatohepatitisben az MCS kontrollhoz képest, mivel a dsRNS a helikáz receptorokon keresztül gyulladáscitokin termelést is indukál, ezért kíváncsiak voltunk, hogy a fokozott májkárosodás a fokozott gyulladáscitokin termelés eredménye-e. Magasabb szérumban és májban TNF α , IL-6 és IL-1 β szinteket mértünk steatohepatitisben, amit a poly I:C stimuláció fokozott mind a kontroll, mind az MCD csoportban. A poly I:C indukálta citokin termelés mértéke azonban lényegesen alacsonyabb volt MCD steatohepatitisben az MCS kontrollhoz képest, ami a gyulladáscitokin szerepe ellen szól a poly I:C indukálta fokozott májkárosodásban. Mivel korábbi vizsgálatok az természetes ölősejtek (NK=natural killer) fontos szerepét jelentették poly I:C indukálta májkárosodásban, következő lépésként az NK-sejtek potenciális szerepét vizsgáltuk. Ugyan magasabb NK-sejt aktiváló ligand szinteket (Pan-Rae, Rae-1 α , Mult-1) találtunk MCD steatohepatitisben mRNS szinten a májban a kontrollhoz képest, a poly I:C nem indukálta tovább az expressziójukat.

Poly I:C necrosist indukál steatohepatitisben az apoptosist további fokozása helyett és növeli a RIP3 expressziót

Hepatocita apoptosist a májkárosodás fontos eleme steatohepatitisben. Ennek megfelelően magasabb caspase-3 aktivitást mértünk az MCD diétával etetett egerek májában a kontrollhoz képest. Poly I:C apoptosist indukált a kontroll csoportban, amit a magasabb caspase-3 aktivitás jelzett, azonban steatohepatitisben nem fokozta tovább a már meglévő apoptosist. Ezzel szemben a poly I:C által kiváltott szérumban HMGB1 szintek szignifikánsan magasabbak voltak MCD-steatohepatitisben az MCS kontrollhoz képest, azt sugallva, hogy a dsRNS stimuláció necrosishoz vezetett steatohepatitis esetén. Az apoptosist és necrosist közötti egyensúly egyik szabályozója a RIP3 (receptor-interacting protein 3) fehérje. Magasabb RIP3 mRNS és fehérje szinteket mértünk MCD-steatohepatitisben a májban a kontrollhoz képest, amit a poly I:C stimuláció tovább fokozott mind a kontroll, mind az MCD-csoportban, azonban az emelkedés csak a steatohepatitis esetén volt tartós. Ez arra engedett következtetni, hogy a poly I:C necrosist indukál steatohepatitisben részben a magasabb RIP3 expresszióknak köszönhetően.

A NASH betegek májbiosziás mintája megerősíti az állatkísérletes modellben nyert eredményeket

Az állatkísérletes eredményeknek megfelelően magasabb MAVS, PSMA7 és RIP3 mRNS szinteket találtunk NASH betegek májbiosziás mintájában mind a kontrollhoz, mind a hepatitis C-s betegek mintájához képest.

KÖVETKEZTETÉSEK, ÖSSZEFOGLALÁS

A disszertációban részletezett munka számos új eredménnyel járult hozzá a nem alkoholos steatohepatitis pathogenezisének feltérképezéséhez és alátámasztja a természetes immunitás fontos szerepét a NASH kialakulásában.

Eredményeinkből az alábbi következtetések vonhatók le:

1. A bakteriális endotoxint érzékelő Toll-like receptor 4 (TLR4) –MD2 komplex hozzájárul a nem alkoholos zsírmáj pathogeneziséhez, érinti mind a zsír akkumuláció, gyulladás és fibrózis kialakulását lévén a TLR4-MD-2 knock-out egerek részlegesen védettek a diéta indukálta steatohepatitis kialakulása ellen.
2. Nem alkoholos steatohepatitis az intracelluláris, multiprotein receptor komplex, inflammaszóma aktiválásával és ezáltal fokozott IL-1 β termeléssel társul számos állatmodellben, míg “egyszerű” zsírmáj esetén nem figyelhető meg inflammaszóma aktiváció
3. A bakteriális eredetű endotoxin (LPS) valószínűleg hozzájárul az inflammaszóma aktiválásához és az exogén, in vivo adott LPS tovább fokozza az inflammaszóma aktivációt és IL-1 β szekréciót.
4. A korábban főleg csak immun eredetű sejtekben vizsgált inflammaszóma komplex kimutatható és aktiválható izolált egér májsejtekben is.
5. A szaturált zsírsavak szenzitizálják a májsejteket a bakteriális eredetű endotoxin (LPS) iránt és inflammaszóma aktivációt eredményeznek. A nem szaturált zsírsavak nem voltak képesek inflammaszóma aktivációt indukálni az általunk használt kísérleti körülmények között.
6. A szaturált zsírsavak az inflammaszóma aktiváción kívül lipoapoptozist is indukálnak és a sérült májsejtek „veszély” molekulákat bocsájtanak a környezetbe.
7. A zsírsav-kezelt májsejtek által kibocsájtott „veszély” molekulák inflammaszóma aktivációt indukálnak a máj eredetű mononukleáris immun sejtekben, ami a sérült hepatociták és immunsejtek közötti kommunikáció fontosságát támasztja alá.
8. A fokozott inflammaszóma aktiváció és IL-1 β termelés hozzájárul a steatosis kialakulásához, azonban az általunk használt állatmodellben az IL-1 jelátvitel defektusa (IL-1 receptor knock-out egerek) nem védi ki a májkárosodás és a NASH indukálta fibrózis kialakulását.
9. NASH betegek májszövetében fokozott inflammaszóma expresszió mutatható ki.

A munkánk hozzájárult továbbá a NASH betegekben megfigyelhető csökkent antivirális immunitás pathomechanizmusának megértéséhez.

10. A Dupla szálú RNS stimuláció által kiváltott antivirális immunreakció és 1-es típusú interferon termelés csökkent a májban nem alkoholos steatohepatitis esetén.

11. A dsRNS-t felismerő helikáz receptorok (RIG-I, Mda5) adapter molekulájának, a MAVS-nak a hepatikus expressziója, mitokondriális lokalizációja és oligomerizációja csökkent nem alkoholos steatohepatitis esetén. A fentiek szükségesek lennének a dsRNS által kiváltott 1-es típusú interferon termeléshez.

12. A MAVS csökkent mitokondriális elhelyezkedése valószínűleg a mitokondriális károsodás és oxidatív stressz következménye. Továbbá, dsRNS az apoptózis további indukálása helyett necrosishoz vezet a NASH által érintett májban részben a fokozott RIP3 expresszióknak köszönhetően.

13. Dupla szálú RNS stimuláció fokozott májkárosodáshoz vezet NASH esetén a csökkent TNF α termelés ellenére.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent saját közlemények

Csak T#, Velayudham A#, Hritz I, Petrsek J, Levin I, Catalano D, Mandrekar P, Dolganiuc A, Kurt-Jones EA, Szabo G: Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and Toll-like receptor 4 expression attenuates non-alcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. (# These authors contributed equally) *Am J Gastroenterol Physiol, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2011;300:G433-41. **IF: 3.522**₍₂₀₁₀₎

Csak T, Ganz M, Pespisa J, Kodys K, Dolganiuc A, Szabo G: Fatty acids and endotoxin activate inflammasome in hepatocytes which release danger signals to activate immune cells in steatohepatitis. *Hepatology*, 2011; 54(1): 133-44.

IF: 10.885₍₂₀₁₀₎

Csak T, Dolganiuc A, Kodys K, Nath B, Petrsek J, Bala S, Lippai D, Szabo G: Mitochondrial antiviral signaling protein defect links impaired antiviral response and liver injury in steatohepatitis in mice. *Hepatology*, 2011; 53(6):1917-31.

IF: 10.885₍₂₀₁₀₎

Ganz M, **Csak T**, Nath B, Szabo G: Lipopolysaccharide induces and activates the Nalp3 inflammasome in the liver. *World J Gastroenterol* 2011; 17(43): 4772-4778.

IF: 2.240₍₂₀₁₀₎

Egyéb közlemények:

Nagy J, Vincze Z, Folhoffer A, Horváth A, **Csak T**, Zelkó R. A Wilson-kór patomechanizmusa és gyógyszeres kezelése. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 2003; 73(4): 237-241.

Keresztes K, Istenes I, Folhoffer A, Lakatos PL, Horvath A, **Csak T**, Vargha P, Kempler P, Szalay F: Autonomic and sensory nerve dysfunction in primary biliaris cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2004, 10 (20):3039-3043.

Folhoffer A, Horváth A, **Csak T**, Nébenführer L, T, Hazslinszky P, Iványi A, Szalay F. Neurofibromatosis, melanoma malignum, hyperthyreosis és HCV pozitivitás esete. *Lege Artis Medicinae* 2004; 14(5): 349-352.

Szalay F, Telegdy L, Szeli D, **Csák T**, Folhoffer A, Horváth A, Abonyi M, Szabó O, Rédei Cs, Nemesánszky E. Rifaximin a hepaticus encephalopathia kezelésében. *Lege Artis Medicinae* 2004; 14(5): 321-325.

Csák T, Folhoffer A, Horváth A, Lengyel G, Kóbori L, Szalay F: Májtranszplantáció kombinált antivirális kezelése. *Orv Hetil* 2004; 145(39):2003-2006.
Horvath A, Folhoffer A, **Csak T**, Komoly S, Szalay F: Cryoglobulinaemiával és súlyos fokú polyneuropathiával járó krónikus C hepatitisz gyógyult esete. *Magyar Belorv Arch* 2004; 57: 194-197.

Nagy J, Folhoffer A, Horvath A, **Csak T**, Taba G, Szentmihályi K, Szalay F, Zelko R: Kinetic study of zinc sulphate release from lipophilic matrices prepared for the therapy of Wilson's disease. *Pharmazie* 2005; 60(7): 524-526. **IF: 0.677**

Szalay F, Folhoffer A, Horvath A, **Csak T**, Speer G, Nagy Zs, Lakatos P, Horvath Cs, Habior A, Tornai I, Lakatos PL: Serum leptin, soluble leptin receptor, free leptin index and bone mineral density in patients with primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol and Hepatol* 2005;17(9):923-928. **IF: 1.690**

Keresztes K, Folhoffer A, Lakatos PL, Istenes I, Horváth A, **Csák T**, Vargha P, Kempler P, Szalay F: Az autonóm és szenzoros neuropathia gyakorisága és rizikófaktorai primer biliáris cirrhosisban. *Magyar Belorv Arch* 2005; 58; 103-112.

Csak T, Folhoffer A, Horvath A, Halász J, Diczhazi Cs, Schaff Zs, Szalay F: Holmes-Adie syndrome, autoimmune hepatitis and coeliac disease. Case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12(9):1485-1487.

Csák T, Folhoffer A, Horváth A, Osztovits J, Halász J, Diczházi Cs, Schaff Zs, Szalay F: Autoimmun hepatitis, coeliakia és Holmes-Adie szindróma együttes előfordulása *Magy Belorv Arch* 2006; 59: 55-58.

Csák T, Folhoffer A, Horváth A, Osztovits J, Papp J, Görög D, Kóbori L, Szalay F: Extrém hypercholesterinaemia és xanthomatosis laparoszkópos cholecystectomy után. Teljes reverzibilitás a iatrogén szűkület műtéti megoldását követően. *Orv Hetil* 2006; 147(15): 705-710.

Horváth A, Folhoffer A, **Csák T**, Osztovits J, Szalay F: Májrák primer biliáris cirrhosisban. Az irodalom áttekintése egy eset kapcsán. *Magyar Belorv Arch* 2006; 61: 207-212.

Folhoffer A, Ferenci P, **Csak T**, Horvath A, Hegedus D, Firneisz G, Osztovits J, Kosa JP, Willheim-Polli C, Szonyi L, Abonyi M, Lakatos PL, Szalay F: Novel mutations of ATP7B gene among 109 Hungarian patients with Wilson disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007, 19(2): 105-111. IF: 1.895

Osztovits J, Horváth T, Abonyi M, Tóth T, Visnyei Z, Bekö G, **Csak T**, Lakatos PL, Littvay L, Fehér J, Kempler P, Kollai M, Szalay F: Chronic hepatitis C virus infection associated with autonomic dysfunction. *Liver Int* 2009; 29(10): 1473-10. **IF: 2.987**

Altörjay I, Vitalis Z, Tornai I, Palatka K, Kacska S, Farkas G, Udvardy M, Harsfalvi D, Dinya T, Orosz P, Lombay B Jr, Par A, Par G, **Csak T**, Osztovits J, Szalay F, Csepregi A, Lakatos PL, Papp M: Mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 2010; 53(3): 484-91. **IF: 9.334**

Papp M, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altörjay I, Foldi I, Udvardy M, Shums Z, Dinya T, Orosz P, Lombay B jr, Par G, Par A, Veres G, **Csak T**, Osztovits J, Szalay F, Lakatos PL. Presence of anti-microbial antibodies in liver cirrhosis -- a tell-tale-sign of compromised immunity? *PloS One* 2010; 5(9): e12957 **IF: 4.411**

Bala S, Marcos M, Kodys K, **Csak T**, Catalano D, Mandrekar P, Szabo G: Upregulation of microRNA-155 in macrophages contributes to increased tumor necrosis

factor alpha (TNF{alpha}) production via increased mRNA half-life in alcoholic liver disease. *J Biol Chem* 2011;286:1436-44. **IF: 5.328**(2010)

Petrasek J, Dolganiuc A, **Csak T**, Kurt-Jones EA, Szabo G: Type-I Interferons protect from Toll-like receptor-9 associated liver injury and regulate IL-1 receptor antagonist in mice. *Gastroenterology* 2011;140:697-708. **IF: 12.032**(2010)

Petrasek J, Dolganiuc A, **Csak T**, Nath B, Hritz I, Kodys K, Catalano D, Kurt-Jones EA, Mandrekar P, Szabo G: Interferon regulatory factor 3 and Type I interferons are protective in alcoholic liver injury in mice via cross-talk of parenchymal and myeloid cells . *Hepatology* 2011;53:649-60. **IF: 10.885**(2010)

Nath B, Levin I, **Csak T**, Petrasek J, Mueller C, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Szabo G: Hepatocyte-specific Hypoxia Inducible Factor-1a is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcoholic steatosis in mice. *Hepatology* 2011;53:1526-37. **IF: 10.885** (2010)