



Inflammaszóma komponensek expressziója és aktivációja agyi endotélsejtekben

Kozma Mihály

Biológus MSc I. évfolyam

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
MTA SZEGED BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

Témavezető: Dr. Krizbai István, tudományos tanácsadó, Biofizikai Intézet,
Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység

Belső konzulens: Prof. Dr. Toldi József, egyetemi tanár, SZTE TTIK Élettani,
Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

XXXII. OTDK, Biológia szekció

2015



1. Absztrakt

A központi idegrendszer immunprivilegizált területnek tekinthető. Ezt a tulajdonságát elsősorban az idegrendszer és a keringési rendszer közötti aktív határfelület, a vér-agy gát biztosítja, amelynek egyik legfontosabb sejt típusa a kapillárisokat alkotó endotélsejt. Egyre több kísérletes bizonyíték van arra, hogy az endotélsejtek képesek a természetes immunitásban résztvevő mintázatfelismerő receptorok (PRR) expressziójára. A PRR-ek egyik legnagyobb tagú családja a NOD-szerű receptorok (NLR-ek). Egyes NLR-ek aktivációjukat követően részt vehetnek egy, a gyulladás során összeszerelődő fehérje komplex, az inflammaszóma kialakításában.

Kutatócsoportunk megvizsgálta az inflammaszóma aktivációt humán agyi endotélsejtekben. Valós-idejű PCR segítségével megállapítottuk, hogy a fontosabb inflammaszóma komponensek (NOD2, NLRP3 és kaspáz-1) expressziója, valamint az inflammaszóma által aktivált IL-1 β és IL-33 mRNS mennyisége megnövekedett a sejtekben lipopoliszacharid (LPS) és NOD2 agonista (MDP) szinkronizált kezelésének hatására. Továbbá sikerült kimutatnunk, hogy az aktív IL-1 β fehérje mennyisége legnagyobb mértékben a kombinált kezelés során növekedett meg, ami gátolható volt kaspáz inhibitorral (Z-VAD-FMK) és MAPK szignalizációs útvonal gátlóval (U0126).

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy agyi endotélsejtekben megvalósulhat az inflammaszóma aktiváció, amely egy új immunológiai szereppel ruházhatja fel ezeket a sejteket.

Kulcsszavak: agyi endotélsejt; inflammaszóma; interleukin; vér-agy gát

2. Tartalomjegyzék

1. Absztrakt.....	2
2. Tartalomjegyzék	3
3. Rövidítéslista	4
4. Bevezető.....	5
4.1. Vér-agy gát	5
4.2. Mintázat felismerő receptorok.....	7
4.2.1. <i>NOD-szerű receptorok</i>	8
5. Célkitűzések	11
6. Anyag és módszerek.....	12
6.1. Vegyszerek	12
6.2. Sejtenyészet és kezelések	12
6.3. Real-time qPCR	12
6.4. TCA-DOC fehérje precipitáció.....	13
6.5. Minta előkészítés és Western-blot	13
6.6. IL-1 β ELISA.....	14
6.7. Statisztikai analízis.....	14
7. Eredmények	16
7.1. Inflammaszóma komponensek expressziója LPS és MDP kezelések hatására	16
7.2. Interleukin expresszió LPS és MDP kezelést követően.....	17
7.3. Interleukin szekréció LPS és MDP kezelések hatására agyi endotélsejtekben	18
7.4. IL-1 β expressziójának szabályozásában résztvevő jelátviteli útvonalak vizsgálata	19
8. Megbeszélés	21
9. Referenciák	24
10. Köszönetnyilvánítás	27
11. Tételes szakmai hozzájárulás	28
12. Megjegyzés	28

3. Rövidítéslista

BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier)

DAMP: sérülés-asszociált molekuláris mintázat (damage associated molecular pattern)

IL: interleukin

KIR: központi idegrendszer

LPS: lipopoliszacharid

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz

MDP: muramyl-dipeptid

NF- κ B: nukleáris faktor- κ B

NLR: NOD-szerű receptor (NOD-like receptor)

NOD: nukleotid-oligomerizációs domén

NVU: neurovaszkuláris egység (neurovascular unit)

PAMP: patogén-asszociált molekuláris mintázat (pathogen associated molecular pattern)

PDTC: pirrolidin-ditiokarbamát

PRR: mintázat felismerő receptor (pattern recognition receptor)

SEM: az átlaghoz tartozó standard hiba (standard error of mean)

TLR: Toll-szerű receptor (Toll-like receptor)

Z-VAD-FMK: karbobenzoxi-valil-alanil-aszpartil-[O-metil]-fluorometilketon

4. Bevezető

4.1. Vér-agy gát

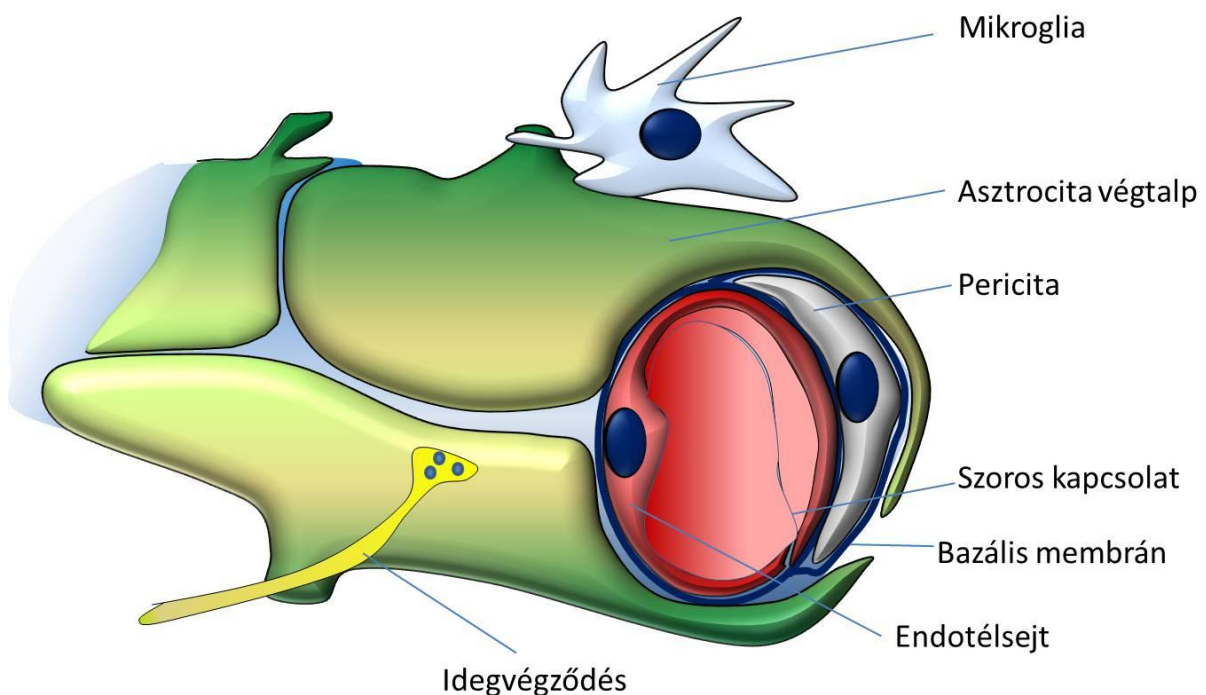
A központi idegrendszerben (KIR) a megfelelő idegi működés szempontjából nagyon fontos a különböző paraméterek (ion koncentráció, pH, hőmérséklet) nagyon szűk tartományon belül tartása. A fokozott metabolikus folyamatok miatt a szervezet teljes oxigénfogyasztásának 20%-a a központi idegrendszerben történik. Emellett a vérben keringő anyagok egy része a központi idegrendszer sejtjei számára nem kívánatosak, vagy akár toxikusak is lehetnek. Ezért is szükséges egy aktív határfelület a központi idegrendszer és a keringési rendszer között (Hawkins, Davis 2005). Ezt a határfelületet nevezzük vér-agy gátnak (BBB), amely a vér-liquor gáttal együtt biztosítja az agyban létrejövő homeosztázist a vér váltakozó értékeivel szemben.

A vér-agy gátat a kapillárisok belső falát alkotó endotélsejtek, a bazális membrán és a beleágyazott periciták, valamint az asztrociták végtalpai alkotják (1. ábra). Az idegsejtekkel és mikrogliaival együtt azonban már egy metabolikus egység jön létre, amelyet neurovaszkuláris egységnek (NVU) hívnak. A gát legmeghatározóbb sejtje az agyi endotélsejt (Wilhelm, Fazakas & Krizbai 2011). Ezek a sejtek jelentősen különböznek a szervezetben máshol előforduló endotélsejtektől. Az endotél sajátosságok (vWf termelés, alkalikus-foszfátáz és γ -glutamil transzpeptidáz magas aktivitása, acetilált LDL felvétele) mellett számos epitél sajátosság is megfigyelhető (folytonos szoros kapcsolatok, kismértékű pinocitózis, nagy transzendoteliális elektromos ellenállás (TEER)). Az endotélsejtek képezik a vér-agy gát kettős funkciójának morfológiai alapját. A szállító szerepe biztosítja egyes vízdékony molekulák transzportját az agyba illetve metabolitok transzportját a vérbe. Ezekhez a folyamatokhoz különböző transzportrendszerekre van szükség (SLC transzporterek). A gátfunkciója révén pedig megakadályozza a nem kívánatos és esetlegesen toxikus molekulák átjutását a vérből az agy irányába. Utóbbi szerepét háromféle módon biztosítja:

1. Az endotélsejtek közötti szoros kapcsolatok és kis mértékben adherens kapcsolatok egy úgynevezett paracelluláris gátat képeznek, amely meggátolja a sejtek közötti víz és vízdékony molekulák szabad áramlását. A szoros kapcsolatokat kialakító molekulákat két csoportba sorolhatjuk: transzmembrán fehérjék és perifériás fehérjék.

A transzmembrán fehérjék segítségével képesek a szomszédos sejtek összekapcsolódni. Ilyen fehérjék például a négy transzmembrán doménnel rendelkező claudinok, az occludin és az egy transzmembrán doménnel rendelkező junkcionális adhéziós molekulák (JAM). A perifériás fehérjék a citoplazmában a szoros kapcsolat alatti területen lokalizálódnak, és lehetnek scaffold fehérjék (ZO-1,-2), szignalizációs molekulák (Cdc42, RhoA) és szabályozó fehérjék (ZONAB) (Bauer et al. 2011).

2. A transzcelluláris gátat az agyi endotélsejtek kismértékű transz- és endocitózisa, valamint a plazmamembránban elhelyezkedő efflux transzportrendszerek alakítják ki. Az efflux transzporterek (ABCB1/Pgp, ABCC család, ABCG2/BCRP) visszajuttatják a vérből az agyi endotélsejtekbe bejutó potenciálisan káros anyagokat a keringésbe.
3. Az enzimatis gát intracelluláris és extracelluláris enzimeket foglal magában. Az ún. „ekto-enzimek” képesek metabolizálni peptideket és ATP-t, ilyen enzimek például a peptidázok és a nukleotidázok. Ezek mellett az intracelluláris enzimek képesek inaktiválni néhány neuroaktív és mérgező anyagot, ilyen enzimek például a monoamin-oxidáz és a citokróm P450 (Abbott, Ronnback & Hansson 2006).



1. ábra: A vér- agy gát alkotó elemei: endotélsejtek, asztrocita végtalpak, periciták és bazális membrán.

Forrás: http://www.szbk.u-szeged.hu/pictures/bf_krizbai_fig1.png

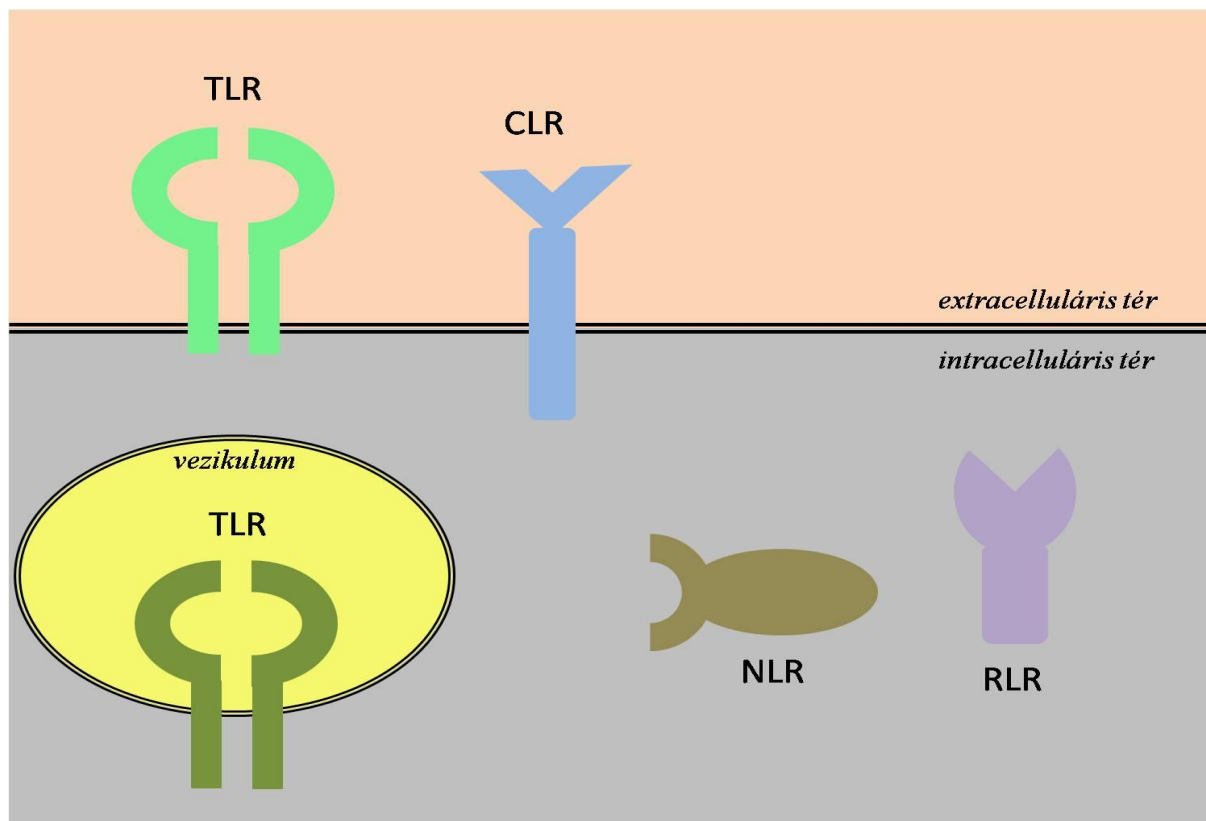
Fiziológiás állapotban a központi idegrendszer gátjainak köszönhetően a KIR immunprivilegizált területnek tekinthető. A gátak ezt úgy biztosítják, hogy az immunsejtek és immunmediátorok csak szintén szigorúan szabályozott útvonalon keresztül juthatnak be a központi idegrendszerbe. Patológias körülmények között azonban nagyon jól szervezett immunválasz alakulhat ki (Muldoon et al. 2013). Mivel az agyi endotélsejtek közvetlenül érintkeznek a vérrel, először ezek a sejtek érintkezhetnek olyan káros endogén molekulákkal vagy szepszis során kórokozókkal, amelyek esetlegesen a központi idegrendszerbe is bejuthatnak. Ezek számos kóros központi idegrendszeri folyamatban meghatározóak lehetnek.

A szervezetbe bejutó patogéneket az immunrendszer sejtjei a mintázat felismerő receptorok (PRR) segítségével ismerik fel. Sok publikáció jelent meg, amelyek igazolják, hogy immunsejtek mellett számos más sejttypus is képes mintázat felismerő receptorok expressziójára, így a központi idegrendszer sejtjei is, mint például az asztrociták, idegsejtek és az agyi endotélsejtek (Lee et al. 2013, Bsibsi et al. 2002, Prehaud et al. 2005). Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy agyi endotélsejtekben a Toll-szerű receptor (TLR) 2/6 heterodimer expresszálódik a sejtekben. Továbbá, amikor e fehérjekomplex ligandjával (zymosan) kezelték a sejteket a zymosan koncentrációfüggő módon csökkentette a szoros kapcsolatot kialakító claudin-5 és occludin fehérjék mennyiségét (Nagyoszi et al. 2010). Ez is bizonyítja, hogy fontos szerepe lehet a PRR-eknek a vér-agy gát patológias folyamatainak szabályozásában.

4.2. Mintázat felismerő receptorok

A természetes immunitás alatt a szervezetünk elsődleges, evolúciósan konzervált védekező mechanizmusait értjük, amelyek megakadályozzák a mikrobiális kórokozók bejutását és elszaporodását. Ezeket a patogéneket elsősorban a szervezetünk immunsejtjein előforduló mintázat felismerő receptorok ismerik fel. A PRR-ek a mikrobák számára esszenciális molekulákat, patogén-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP-okat) ismernek fel és olyan szignalizációs utak aktiválódnak az immunsejtekben, amelyek következtében gyulladásos citokinek, kemokinek és interferonok (IFN-ok) expresszióját figyelhetjük meg (Kawai, Akira 2007). Azonban a PRR-ek nem csak PAMP-okat tudnak érzékelni, hanem úgynevezett endogén, sérülés-asszociált molekuláris mintázatokat (DAMP-okat) is képesek felismerni, amelyek szintén lokálisan gyulladást válthatnak ki.

A mintázat felismerő receptorokat négy fő családba lehet osztani. A C-típusú lektin receptorok (CLR) és a Toll-szerű receptorok (TLR) membránköttelen helyezkednek el, míg a retinsav-indukált gén-I (RIG-I)-szerű receptorok (RLR) és a nukleotid-kötő oligomerizációs domén (NOD)-szerű receptorok (NLR) intracellulárisan érzékelik a PAMP-okat és DAMP-okat (2. ábra).



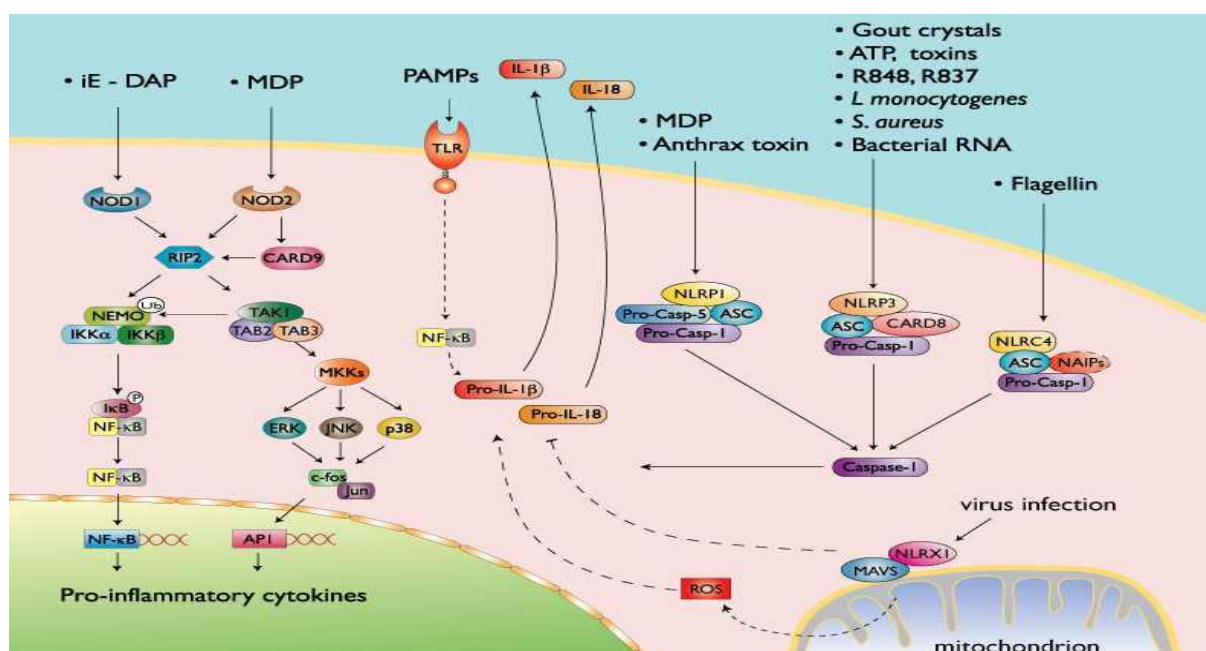
2. ábra: Mintázat felismerő receptorok csoportjai.

4.2.1. NOD-szerű receptorok

A PRR-ek egyik legnagyobb családja a NOD-szerű receptorok. Az NLR-ek három doménből felépülő fehérjék: a C-terminális doménjében leucin-gazdag ismétlődések (LRR) figyelhetők meg; centrálisan egy nukleotid-kötő domén helyezkedik el; és az N-terminális végén fehérje-fehérje interakciót kialakító domén található. Az utóbbi alegység diverzitásának köszönhetően az NLR-eket öt alcsaládba sorolhatjuk: NLRA, NLRB, NLRC, NLRP és NLRX. A tudomány mai állása szerint emberben 22, rágcsálóban 34 NLR gént tudtak azonosítani, azonban sok receptor funkciójáról keveset tudunk (Kersse et al. 2011, Zambetti, Mortellaro 2014).

Az NLR-ek aktivációját nagyon sokféle mikrobiális alkotóelem és veszélyjelzés tudja aktiválni. A NOD1-et és a NOD2-t bakteriális sejtfal alkotó, a peptidoglükán fragmentjei (muramyl-dipeptid (MDP) és mezo-diaminopimelinsav) képesek aktiválni. Az NLRC4 a bakteriális flagellint képes érzékelni, míg az NLRP1 *B. anthracis* halálos toxinja és MDP hatására aktiválódik. A legtöbb ismert ligandja az NLRP3-nak van, mint például: MDP, bakteriális toxinok, RNS, ATP és hialuronsav (Shaw, Lamkanfi & Kanneganti 2010). Azonban sok olyan NLR-ről tudunk, amelyeknek ligandjait még nem ismerjük pontosan. Aktivációjuk két fő szignalizációs útvonalban folytatódhat: NF- κ B útvonal, vagy MAPK útvonal, amelyek végén olyan gyulladásokeltő mediátorok kifejeződése figyelhető meg, amelyek az adaptív immunválasz elindításában is fontosak (3. ábra) (Franchi et al. 2009).

Az NLR-ek közül eddig az NLRP1-ről, az NLRP3-ról, az NLRP6-ról és az NLRC4-ről ismeretes, hogy részei lehetnek különböző inflammaszóma komplexnek. Az inflammaszómákon belül az NLR-ek egy adaptor fehérje (ASC) közvetítésével kapcsolódnak össze a kaszpáz-1-gyel vagy kaszpáz-5-tel (NLRP1 inflammaszóma esetén), illetve még részei lehetnek egyéb fehérjék is (CARDINAL). A komplexben proteolitikus módon aktiválódik a kaszpáz-1 és a kaszpáz-5, amelyek képesek szintén proteolitikus hasítással aktiválni az alábbi citokineket: IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-37. Az inflammaszómák részt vesznek a gyulladásos folyamatok kialakulásában, valamint a piroptózis (egy az apoptózistól eltérő programozott sejthalál gyulladásos folyamatokban) indukciójában (Schroder, Tschopp 2010).



3. ábra: NLR-ek és inflammaszómák szignalizációs útjai.

Forrás: http://www.invivogen.com/images/NLR_pathway.jpg

Hasonlóan más mintázat felismerő receptorokhoz a NOD-szerű receptorok is expresszálódhatnak nem immunsejtekben is, mint például agyi endotélsejtekben. Idáig agyi endotélsejtekben az NLR-ek családjából csak két tagot mutatattak ki. Reimer és kollégáinak 2010-ben sikerült kimutatni egér agyi endotélsejtekben, hogy *Plasmodium berghei* (malária kórokozója) fertőzés hatására megnövekszik az NLRP3 mRNS mennyisége és IFN- γ hozzáadása ezt tovább növeli. Továbbá Girvin és munkatársainak 2002-es eredményeik alapján IFN- γ indukció hatására indukálódik NLRA mRNS expressziója (Girvin et al. 2002, Reimer et al. 2010). Ezek mellett kutatócsoportunknak sikerült kimutatni, hogy az NLRP3 és NLRA mellett még további NLR-ek is expresszálódnak fiziológiás állapotban agyi endotélsejtekben.

5. Célkitűzések

A vér-agy gátat alkotó agyi endotélsejtek NLR expressziójáról alig áll rendelkezésre adat. Kutatócsoportunknak a közelmúltban humán agyi endotélsejtekben sikerült kimutatni különböző NLR-eket és inflammaszóma komponenseket. Jelenlegi kísérleteink során az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat:

- Hogyan változik meg az inflammaszómákat alkotó NLR-ek, illetve egyéb inflammaszóma alkotók (kaspázok, ASC) expressziója patogén-asszociált molekuláris mintázatok hatására?
- Patogén-asszociált molekuláris mintázatok milyen mértékben változtatják meg a komplex által aktivált interleukinek (IL-1 β , -18, -33, -37) mRNS mennyiségét agyi endotélsejtekben?
- Lehetséges-e inflammaszóma aktiváció agyi endotélsejtekben?
- Milyen jelátviteli útvonalon keresztül szabályzódik az interleukinek expressziója agyi endotélsejtekben?

6. Anyag és módszerek

6.1. Vegyszerek

Minden reagenst, ha másként nincs feltüntetve, a Sigma Aldrich-tól szereztük be (St. Louis, MO, USA). A kísérletekhez az alábbi vegyszereket használtuk: muramyl-dipeptid (MDP) (Bachem, Bubendorf, Svájc), lipopoliszacharid (LPS) és karbobenzoxi-valil-alanil-aszpartil-[O-metil]-fluorometilketon (Z-VAD-FMK) (Tocris Bioscience, Bristol, UK), U0126, PDTC (pirrolidin-ditiokarbamát).

6.2. Sejtenyésztés és kezelések

Kísérleteinkhez egy humán agyi endotélsejtvonal sejtjeit (hCMEC/D3) használtuk. A sejteket egy korábban leírt eljárás alapján tenyésztettük (Weksler et al. 2005). Patkányfarok kollagénnel bevont csészében növesztettük a sejteket EBM-2 médiumban. A médiumot EGM-2 Bullet Kit-tel (Lonza) és 2,5% magzati szarvasmarha szérummal (FBS) (Sigma) egészítettük ki.

Az agyi endotélsejtek „konfluens monolayer”-ét 1 µg/ml LPS-sel vagy 100 µg/ml MDP-vel kezeltük 24 órán át vagy kombinált kezelést alkalmaztunk: 6 órás LPS kezelés, amelyet 18 órás MDP kezelés követett (LPS→MDP). Az inflammaszóma aktiváció vizsgálatához a sejteket 20 µM Z-VAD-FMK-val kezeltük 24 órán keresztül. A jelátviteli útvonalak vizsgálatához 10 µM U0126-tal és 100 µM PDTC-vel kezeltük a sejteket 24 órán keresztül.

6.3. Real-time PCR

A kontroll és a kezelt sejtenyészetekből az RNS-t TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) reagens segítségével izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS-t DNase-zal (Roche, Mannheim, Németország) kezeltük, hogy elkerüljük a genomi DNS felszaporozódását. Az RNS-t reverz transzkripció kit segítségével írtuk át cDNS-é (iScript

cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA vagy Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA). Az amplifikációt Bio-Rad iQ5 eszközön hajtottuk végre, amelyhez Bio-Rad iQ Supermix-et vagy Thermo Fisher Scientific's Maxima SYBR Green qPCR Master Mix-et használtunk a következő feltételek mellett: 40 ciklus alatt 95°C 15 másodpercig, 56-63°C 30 másodpercig és 72°C 30 másodpercig. Az amplifikációhoz humán inflammaszóma alkotók és citokinek „forward” és „reverse” primer párait használtuk fel (1. táblázat). A reakció belső kontrolljaként gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) használtunk. A küszöb ciklus meghatározását az eszközhöz tartozó szoftver segítségével végeztük el.

6.4. TCA-DOC fehérje precipitáció

A sejtenyészetről levett médium fehérjetartalmát TCA-DOC módszerrel csaptuk ki. A mintákat 10% DOC-kal kezeltük, vortexszel összekevertük, majd 30 percig jégen inkubáltuk. 11%-os végkoncentrációban triklórecetsavat (TCA) adtunk hozzá, összekevertük, 10500 g erősséggel lecentrifugáltuk 4°C-on 15 percig. Ezután a pelletet kétszer megmostuk jéghideg acetonnal. A pelletet levegőn megszáritottuk, majd visszaoldottuk jéghideg RIPA sejtízis pufferben (20mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% nátrium-dezoxikolat, 1 mM Na-ortovanadát, 10mM nátrium-fluorid, 0,1% SDS, 1mM EDTA és 1mM Pefabloc).

6.5. Minta előkészítés és Western-blot

A RIPA pufferben visszaoldott precipitátumot 9500 g erősséggel 15 percig centrifugáltuk 4°C-on. A felülúszó (szolubilis frakció) fehérje tartalmát Bradford (BCA) módszerrel határoztuk meg (Pierce, Rockford, IL, USA). A szolubilis frakciót 95°C-on forraltuk Laemmli minta pufferben 3 percig. A fehérjéket standard denaturáló SDS-PAGE elektroforézissel szétválasztottuk, majd polivinilidén-difluorid (Bio-Rad Laboratóriumok, Hercules, CA, USA) membránra „blottoltuk”. A nem-specifikus kötődéseket TBS-T-ben (Tris pufferelt só 0,1% Tween-20-szal) 3%-os szarvasmarha szérum albuminnal blokkoltuk. A membránt blokkolás után az elsődleges antitesteket tartalmazó TBS-T-ben inkubáltuk az alábbi hígításban: anti-humán IL-1 β : 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

Ezt követően a membránokat háromszor 10 percig TBS-t-ben mostuk és a másodlagos antitesteket tartalmazó TBS-T-ben inkubáltuk: 1:10000 hígításban nyúl ellen termeltetett HRP konjugált másodlagos antitesttel (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Ezután három mosási lépést követően az immunreakciót a SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) segítségével tettük láthatóvá.

6.6. IL-1 β ELISA

Az agyi endotélsejtek IL-1 β szekréciójának mennyiségi meghatározásához humán IL-1 β szilárd fázisú „szendvics” ELISA-t (R&D Systems, Inc. MN, USA) használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A sejt kultúra médiumait összegyűjtöttük a kontroll és a kezelt sejtekről, majd minden mintához 1 mM EDTA-t adtunk. Ezután 2500 g erősséggel 4°C-on 1 percig centrifugáltuk, hogy leülepedjen a sejt törmelék. Továbbiakban a felülúszót használtuk mintaként a vizsgálathoz.

6.7. Statisztikai analízis

Minden bemutatott adat átlag $\pm$ SEM (standard error of mean). Az értékek összehasonlításához varianciaanalízist használtunk Fisher LSD illetve Bonferroni post hoc tesztekkel. Az eltéréseket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük $P < 0,05$ esetén. Minden kísérletet legalább háromszor végrehajtottunk.

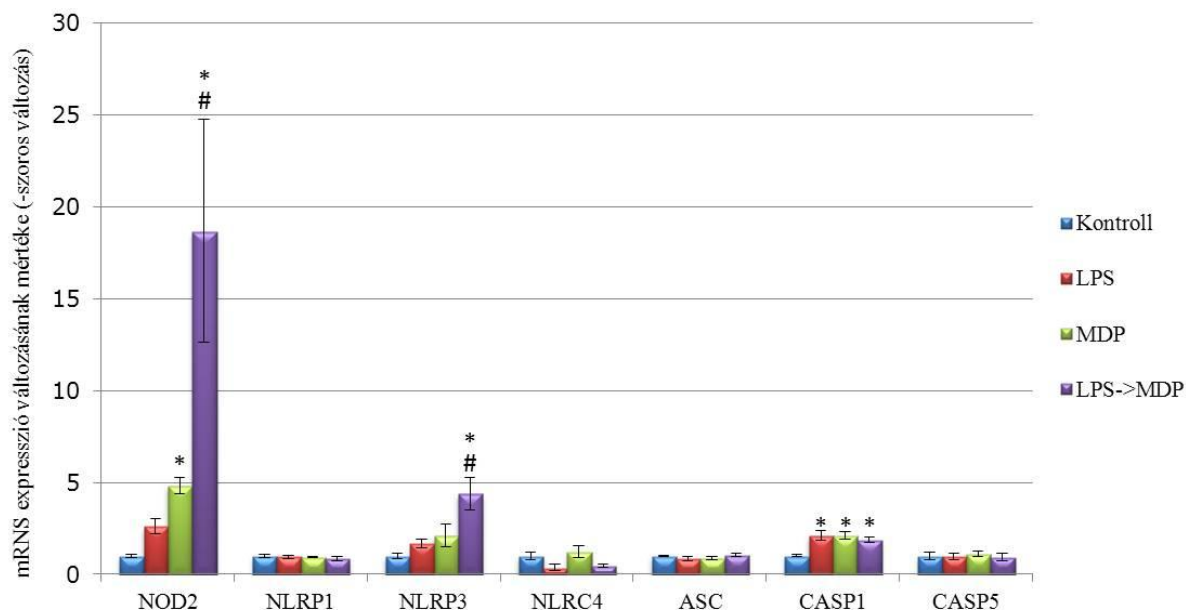
Családnév	Szinonim	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Amplikon hossz (bp)
NOD2	CARD15	TGCCACGGTGAAAGCGAATG	CGAGACTGAGCAGACACCGT	144
NLRP1	NALP1	GGATCAGGGATCAGGCTGCA	CTCGGGCTATCAGCTGCTCT	193
NLRP3	NALP3, CRYOPYRIN, CIAS1	AGTGGGATTCGAAACACGTGCA	GTGCCGTGTTCACTGCCTGGTAT	381
NLRC4	IPAF, CARD12	CCAGTCCCCTCACCATAGAAG	ACCCAAGCTGTCAGTCAGACC	119
KASZPÁZ-1	IL1BC	TCTTGAGACATCCACAATGGGC	TGCGCTCTACCATCTGGCTGC	140
KASZPÁZ-5	ICH3	TCTGTTTGCAAGATCCACGA	GTTCTATGGTGGGCATCTGG	223
ASC	PYCARD	GCCGGGGATCCTGGAGCCAT	GCGCAGCACGTTAGCGGTGA	240
IL-1 β	IL1F2	AGCTCGCCAGTGAAATGATG	GCCCTTGCTGTAGTGGTGGT	164
IL-18	IGIF	CTTCATTGACCAAGGAAATCGGCCT	AGCCATACCTCTAGGCTGGCTATCT	124
IL-33	IL-1F11	ATCAGGTGACGGTGTTGATGG	CCTGGTCTGGCAGTGGTTTT	133
IL-37	IL-1F7	CAGCCTCTGCGGAGAAAGGAAGT	GTTTCTCCTTCTTCAGCTGAAGG	120
GAPDH	G3PD	GTGAAGGTCGGTGTCACG	GTGAAGACGCCAGTAGACTC	298

1. táblázat: Inflammaszóma alkotók, interleukinek és a vizsgálathoz felhasznált primerek.

7. Eredmények

7.1. Inflammaszóma komponensek expressziója LPS és MDP kezelések hatására

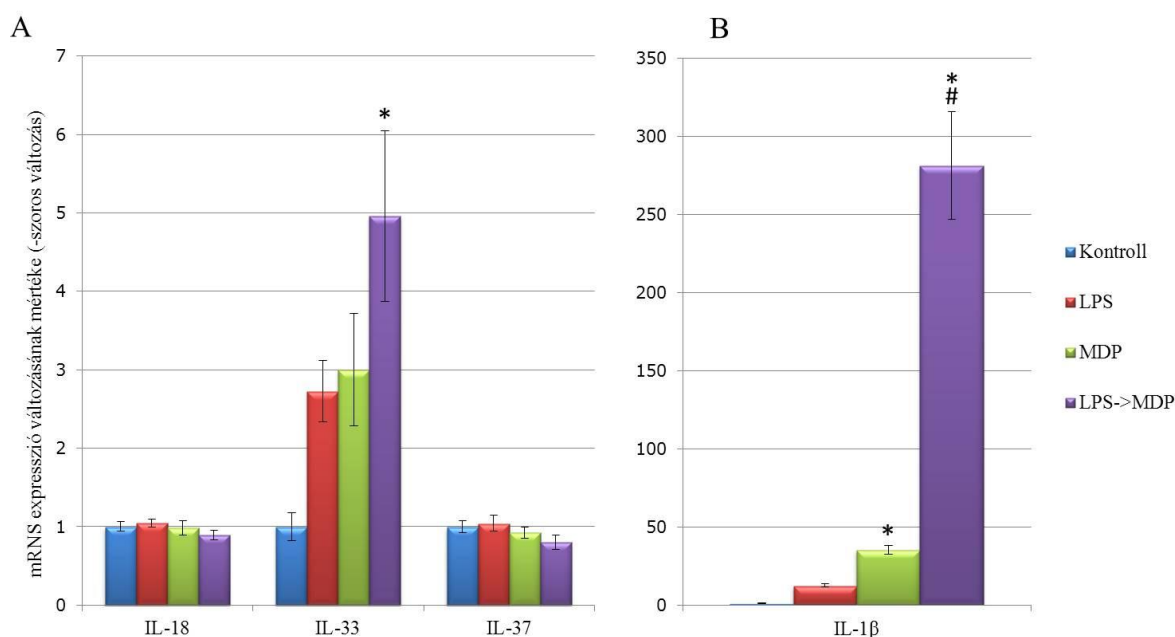
A NOD-szerű receptorok szabályozásának vizsgálata során kutatócsoportunk korábban kiderítette, hogy agyi endotélsejtekben a NOD2 és az NLRP3 a legérzékenyebb NLR-ek különböző stressz faktorokra nézve. A NOD2 az NLRP1 inflammaszóma részét képezi, az NLRP3 pedig a róla elnevezett inflammaszóma legfontosabb részét alkotja. Ezeknek az NLR-eknek az MDP a ligandja, mely hatására adott inflammaszómák aktivációja is megfigyelhető. Emellett befolyásolhatja az inflammaszóma komponensek génexpresszióját is. Az inflammaszóma aktiváció előtt szükséges továbbá egy úgynevezett priming stimulus, amely iniciálja az inflammaszóma komponensek átírását. Jelen kísérleteink során ehhez LPS-t alkalmaztunk. A következőkben tehát megvizsgáltuk az NLRP1 és NLRP3 inflammaszóma komponensek génexpressziójának változását LPS vagy MDP kezelést követően. Továbbá még megvizsgáltuk a két kezelés kombinációját is. Az LPS önmagában a NOD2 és a kaszpáz-1 génexpresszióját kétszeresére növelte meg - utóbbit szignifikáns mértékben -, míg a többi inflammaszóma alkotó mennyisége nem változott jelentősen. Az MDP kezelés hatására a NOD2 expresszió ötszörösére és a kaszpáz-1 expresszió kétszeresére növekedett. Mindezek mellett az LPS-sel és MDP-vel történő kombinált kezelés után a NOD2 génexpresszió több mint húszszoros, az NLRP3 mRNS szint négyszeres és a kaszpáz-1 transzkriptum kétszeres növekedést mutatott. Ezzel szemben más inflammaszóma komponensek mRNS mennyisége nem változott szignifikánsan (4. ábra).



4. ábra: Az inflammaszóma komponensek expressziójának változása LPS és MDP hatására. A humán agyi endotélsejteket külön-külön LPS-sel (1 µg/ml), mint „priming” és MDP-vel (100 µg/ml), mint aktivátor, valamint a kettő kombinációjával is kezeltük 24 órán keresztül. A kezeléseket követően RNS-t izoláltunk a sejtekből, majd a belőle készült cDNS-t RT-qPCR kísérlethez használtuk fel. Minden PCR-t három párhuzamos reakcióval hajtottunk végre. Az ábrán három független kísérlet küszöbértékeinek változását ± SEM-et (standard error of mean) láthatjuk. *P<0,05 a kontrollhoz képest; #P<0,05 az LPS és MDP kezelésekhez képest.

7.2. Interleukin expresszió LPS és MDP kezelést követően

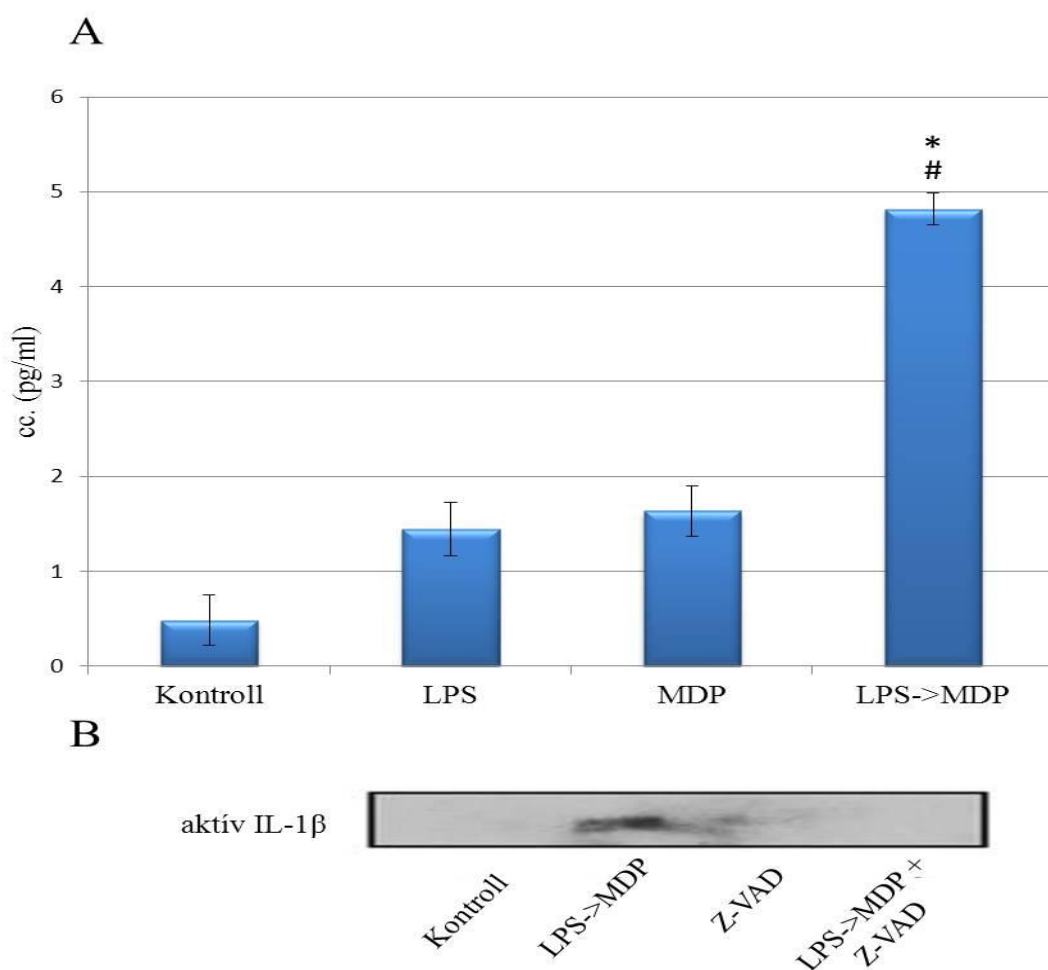
Jól ismert, hogy az NLRP1 és NLRP3 inflammaszómák proteolitikus hasítással aktiválják az IL-1 β -t, -18-t, -33-t és -37-t. Továbbiakban megvizsgáltuk ezen interleukinek mRNS expressziójának változását LPS és/vagy MDP hatására. Az IL-18 és IL-37 transzkriptumok mennyisége nem változott a kezeléseket követően. Az IL-33 mRNS mennyisége körülbelül háromszorosára növekedett LPS vagy MDP kezelések után (ami azonban még statisztikailag nem volt szignifikáns), a kombinált kezelést követően azonban több mint ötszörös növekedést figyelhattunk meg a transzkriptum mennyiségében (5. A ábra). Az IL-33 mRNS szintjének növekedéséhez képest nagyobb mértékű változást figyelhattunk meg az IL-1 β mRNS szintje esetében. Az LPS önmagában kb. tízszeresére növelte meg az IL-1 β transzkriptum szintjét, míg az MDP közel ötvenszeres változást eredményezett. A legnagyobb mértékű változást a kombinált kezelés eredményezte, amely során közel háromszázszoros IL-1 β mRNS növekedést figyeltünk meg (5. B ábra).



5. ábra: Interleukinek expressziójának változása LPS és MDP hatására. A: Az IL-18, IL-33 és IL-37 mRNA expressziója. **B:** Az IL-1β mRNA expressziója. A humán agyi endotélsejteket a már korábban leírt módon kezeltük LPS-sel („priming”) és/vagy MDP-vel (aktiváció). A kezeléseket követően RNS-t izoláltunk a sejtekből, majd a belőle készült cDNS-t RT-qPCR kísérlethez használtuk fel. Minden PCR-t három párhuzamos reakcióval hajtottunk végre. Az ábrán három független kísérlet küszöbértékeinek változását $\pm$ SEM-et (standard error of mean) láthatjuk. * $P < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $P < 0,05$ az LPS és MDP kezelésekhöz képest.

7.3. Interleukin szekréció LPS és MDP kezelések hatására agyi endotélsejtekben

Mivel a kezelések jelentős mértékben megnövelték az IL-1β mRNA mennyiségét, ezért megvizsgáltuk ELISA-val különböző kezeléseket követően az IL-1β fehérje mennyiségét a felülúszóban. Kontroll körülmények között a citokin szintje a médiumban a mérhető szint alatt volt. LPS vagy MDP kezelés után alig változott az IL-1β mennyisége, de a kombinált kezelést követően 5 pg/ml-re emelkedett a fehérje koncentráció (6. A ábra). Ahhoz, hogy bebizonyítsuk, hogy a folyamatot a kaspáz-1 mediálja, egy kaspáz inhibitorral (Z-VAD-FMK) is kezeltük a sejteket. Western-blottos eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy míg a kombinált LPS és MDP kezelést követően volt aktív IL-1β fehérje, addig LPS és MDP mellett a Z-VAD-ot alkalmazva az IL-1β aktív fehérje mennyisége a detektálható szint alá csökkent (6. B ábra).

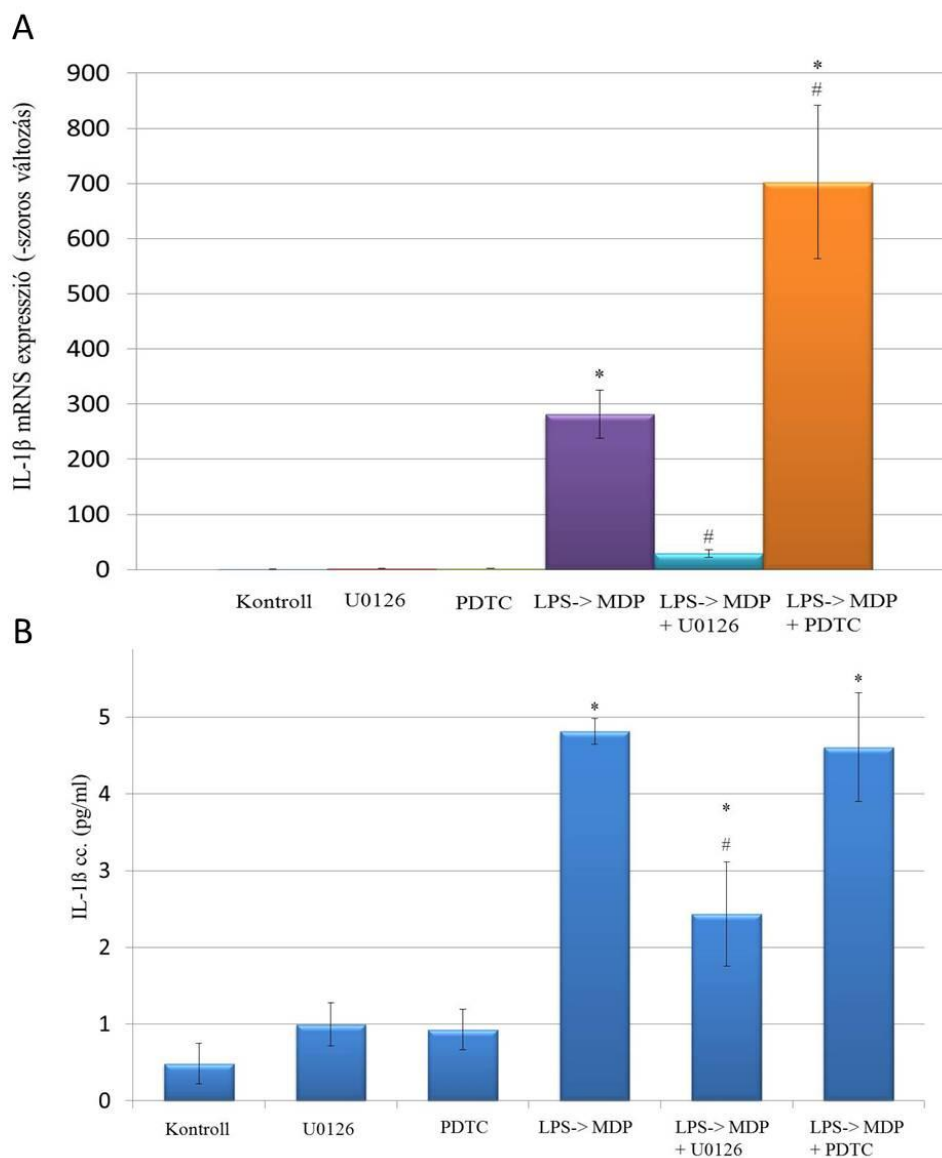


6. ábra: IL-1 β fehérje szekréció LPS és MDP hatására. **A:** IL-1 β fehérje szint az agyi endotélsejtek tápfolyadékában LPS és/vagy MDP kezelést követően. Szilárd fázisú „szendvics” ELISA-val meghatároztuk a felülszóban az IL-1 β koncentrációját. A diagram a kvantifikált eredmények átlag értékét mutatja pg/ml-ben $\pm$ SEM. **B:** Inflammaszóma aktiváció gátlása agyi endotélsejtekben. A hCMEC/D3 sejtvonal sejtjeit LPS-sel (1 μ g/ml), MDP-vel (100 μ g/ml) és Z-VAD-FMK-val (20 μ M) kezeltük külön-külön és kombinációban 24 órán át. TCA-DOC precipitációt követően a felülszóban megtalálható IL-1 β fehérjét Western-blottal detektáltuk.

7.4. IL-1 β expressziójának szabályozásában résztvevő jelátviteli útvonalak vizsgálata

A következőkben azt is megvizsgáltuk, hogy az IL-1 β termelését milyen jelátviteli útvonalak szabályozzák. Ehhez egy MAPK jelátviteli útvonal gátlóval (U0126) és egy NF- κ B aktivációt gátló szerrel (PDTC) kezeltük a sejteket kontroll körülmények között és LPS->MDP kombinált kezelés mellett. Az inhibitoroknak önmagában nem volt szignifikáns hatása az IL-1 β mRNS vagy fehérje szintjére. Az U0126 ugyanakkor részben kivédte az LPS->MDP

okozta IL-1 β mRNS szint növekedést, ami IL-1 β fehérje szekréció csökkenéssel járt együtt. Ezzel szemben a PDTC tovább emelte az IL-1 β mRNS mennyiségét, de ez fehérje szinten nem nyilvánult meg (7. ábra).



7. ábra: IL-1 β expresszió szabályozás agyi endotélsejtekben. **A:** A humán agyi endotélsejteket 10 μ M U0126-tal (MAPK inhibitor), 100 μ M PDTC-vel (NK- κ B gátlószer) és LPS->MDP-vel (1 μ g/ml és 100 μ g/ml) kezeltük külön-külön illetve kombinációban. A kezeléseket követően RNS-t izoláltunk a sejtekből, majd a belőle készült cDNS-t RT-qPCR kísérlethez használtuk fel. Minden PCR-t három párhuzamos reakcióval hajtottunk végre. **B:** Az aktív IL-1 β fehérje koncentrációja U0126, PDTC, LPS->MDP kezeléseket követően. A diagram a kvantifikált eredmények átlag értékét mutatja pg/ml-ben $\pm$ SEM. Az ábrán három független kísérlet küszöbértékeinek változását $\pm$ SEM-et (standard error of mean) láthatjuk. * $P < 0,05$ a kontrollhoz képest; # $P < 0,05$ az LPS és MDP kezelésekhöz képest.

8. Megbeszélés

A különböző típusú inflammaszóma komponensek expressziója és aktivációja sejtípus-specifikus. Korábban ezeket a fehérjekomplexeket elsősorban immunsejtekben mutatták ki. Azonban számos kísérlet igazolja, hogy az NLR-eknek, kaspáz-1-nek, -5-nek és az ezeket összekapcsoló adaptor fehérjéknek nemcsak ezekben a sejtekben van nagy szerepe az inflammaszómák kialakításában, hanem más sejtípusokban is, mint például epitélsejtekben, adipocitákban és a KIR sejtjeiben (Reimer et al. 2010, Rosenstiel et al. 2003, Stroh et al. 2008).

Annak ellenére, hogy a különböző központi idegrendszeri betegségek során fellépő gyulladásról sok információval rendelkezünk, viszonylag keveset tudunk az inflammaszómák expressziójáról és funkciójáról a központi idegrendszer sejtjeiben. Mikroglában, mint rezidens makrofágban, kimutatták az NLRP3 inflammaszómát amiloid- β indukciót követően (Halle et al. 2008). Agyi idegsejtekben ischemiás állapotban az NLRP1 inflammaszóma összeszerelődése figyelhető meg (Abulafia et al. 2009), valamint szintén amiloid- β hatására az NLRP1 inflammaszóma összeszerelődés következtében a neuronokban gyulladásos citokinek (IL-1 β) szekréciója vagy piroptózis figyelhető meg (Tan et al. 2014). Jelenlegi ismereteink szerint asztrocitákban fiziológiás állapotban a fő inflammaszóma komplexek (NLRP1, NLRP3, AIM2 és NLRC4) mRNS szinten megtalálhatók, és ezek közül az NLRP3 inflammaszóma fordul elő a legnagyobb mennyiségben. Ezen túlmenően kimutatták, hogy LPS és etanolos kezeléseket követően asztrocitákban az NLRP3 inflammaszóma alkotók mennyiségei megnövekednek, és aktiválódik a komplex összeszerelődése, ami piroptózist indukálhat (Alfonso-Loeches et al. 2014). Ráadásul asztrocitákban ATP kezelés következtében egy újabb inflammaszómát sikerült azonosítani, melyben az NLRP2 található meg (Minkiewicz, de Rivero Vaccari & Keane 2013).

Az agyi endotélsejtekben az inflammaszóma komponensek expressziójáról és funkciójáról hiányos a szakirodalom. Egér agyi endotélsejtekben igazolták, hogy a maláriát kiváltó kórokozó (*Plasmodium berghei*) és IFN- γ hatására megjelenik az NLRP3 mRNS-e (Reimer et al. 2010). IFN- γ jelenlétében agyi endotélsejtekben az NLRA mRNS-e is expresszálódik (Girvin et al. 2002). Azonban nem ismert, hogy agyi endotélsejtekben aktiválódhatnak-e az inflammaszómák.

Kutatócsoportunknak korábban sikerült kimutatni, hogy humán agyi endotélsejtekben az alábbi gének fejeződnek ki, amelyek termékei részt vehetnek inflammaszómák kialakításában: NOD2, NLRP1, NLRP3, ASC, kaspáz-1 és kaspáz-5.

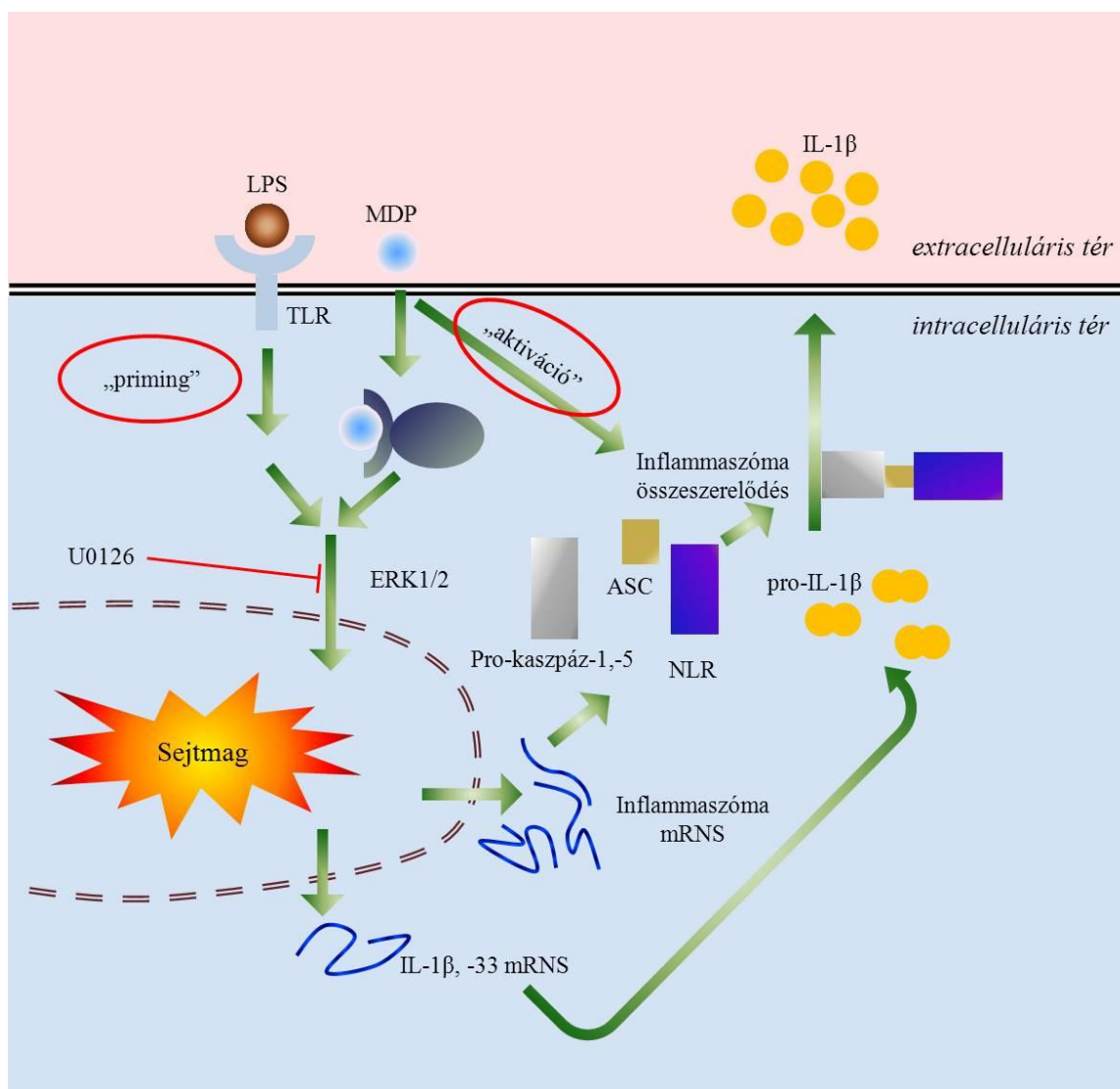
Jelenlegi kísérleteink során bebizonyosodott, hogy agyi endotélsejtekben az NLRP1 és NLRP3 inflammaszóma komponensek expressziója megváltozhat priming és aktiváció hatására. Míg maga az NLRP1 mRNS mennyisége nem változott LPS és MDP kezelést követően, addig a NOD2, NLRP3 és kaspáz-1 transzkriptumok mennyisége megnövekedett. Figyelemre méltó, hogy az LPS és MDP kezeléseknak szinergikus hatása van (Sun, Ding 2012). Ez a hatás figyelhető meg az NLRP3 és NOD2 esetében is, vagyis a kombinált kezelés során sokkal nagyobb NLRP3 és NOD2 mRNS szint figyelhető meg az agyi endotélsejtekben, mint LPS vagy MDP kezeléseket követően.

Kutatócsoportunk azt is felderítette korábban, hogy az inflammaszómák által aktivált IL-1 β , -18, -33 és -37 mRNS-e is előfordul agyi endotélsejtekben kontroll körülmények között. Ezért megvizsgáltuk az NLRP1 és NLRP3 inflammaszóma komponensek mellett ezen interleukinek expressziójának változását is. Az IL-18 mRNS mennyisége nem változott az LPS és/vagy MDP kezelés hatására a monocitákhoz hasonlóan (Ghonime et al. 2014). Továbbá az IL-37 mRNS szintjében sem tapasztaltunk változást a kezeléseket követően. Azonban korábban sikerült kimutatni, hogy monocitákban LPS-sel indukálható ez az interleukin, ami a szabályozás sejt-specifikus voltára utal (Bulau et al. 2014). Az IL-33 transzkriptum mennyiségét az LPS és MDP egyedül és kombinációban is képes volt indukálni. A legnagyobb változás a négy interleukin közül az IL-1 β -nál figyelhető meg. Már az LPS és MDP külön-külön is több tízszeres növekedést idéz elő, azonban a kettő kombinációját követően több százszoros növekedés figyelhető meg az IL-1 β mRNS mennyiségében. Hasonlóan, mint van Heel és munkatársai kísérletében, ahol monocitákat kezelve LPS és MDP-vel hasonló tendenciájú növekedés figyelhető meg (van Heel et al. 2005).

A TLR és NLR közös aktivációja – az LPS és MDP következtében – nem csak transzkriptum szinten növeli meg az IL-1 β szintjét, hanem szignifikáns IL-1 β felszabaduláshoz is vezet. A felszabadulás egy kaspáz függő folyamat, amely inflammaszóma aktivációt jelez (Schroder, Tschopp 2010). Ennek igazolására, a kombinált kezelés mellett Z-VAD-FMK-val (kaspáz gátlószerrel) (Montolio et al. 2005) is kezeltük az agyi endotélsejteket. A hármas kezelést követően nem volt IL-1 β aktív fehérje a médiumban, ami azt jelzi, hogy az aktív IL-1 β szekréció egy kaspáz-, vagyis inflammaszóma-függő folyamat.

Azt is sikerült kimutatnunk, hogy az IL-1 β inflammaszóma-függő szekrécióját szabályozó jeltovábbító útvonalak között fontos szerepe van az ERK1/2 mitogén-aktivált protein kinázoknak (MAPK) (8. ábra), a humán monocitákban megfigyeltekhez hasonlóan (Liang et al. 2013).

Az eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy agyi endotélsejtekben expresszálódnak inflammaszóma komponensek, valamint hogy ezek a sejtek képesek IL-1 β termelésére inflammaszóma aktivációt követően. Ez alapján az agyi endotélsejteknek nagyobb szerepe lehet a központi idegrendszer különböző gyulladásos folyamatainak patomechanizmusában, mint azt korábban gondoltuk.



8. ábra: LPS és MDP kezelést követően megnövekszik az inflammaszóma komponensek, az IL-1 β és IL-33 mRNA expressziója, valamint az MDP inflammaszóma aktiválódást vált ki agyi endotélsejtekben, amely aktív IL-1 β fehérje szekréciójához vezet.

9. Referenciák

- Abbott, N.J., Ronnback, L. & Hansson, E. 2006, "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 7, no. 1, pp. 41-53.
- Abulafia, D.P., de Rivero Vaccari, J.P., Lozano, J.D., Lotocki, G., Keane, R.W. & Dietrich, W.D. 2009, "Inhibition of the inflammasome complex reduces the inflammatory response after thromboembolic stroke in mice", *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 29, no. 3, pp. 534-544.
- Alfonso-Loeches, S., Urena-Peralta, J.R., Morillo-Bargues, M.J., Oliver-De La Cruz, J. & Guerri, C. 2014, "Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells", *Frontiers in cellular neuroscience*, vol. 8, pp. 216.
- Bauer, H.C., Traweger, A., Zweimueller-Mayer, J., Lehner, C., Tempfer, H., Krizbai, I., Wilhelm, I. & Bauer, H. 2011, "New aspects of the molecular constituents of tissue barriers", *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, vol. 118, no. 1, pp. 7-21.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D. & van Noort, J.M. 2002, "Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 61, no. 11, pp. 1013-1021.
- Bulau, A.M., Nold, M.F., Li, S., Nold-Petry, C.A., Fink, M., Mansell, A., Schwerd, T., Hong, J., Rubartelli, A., Dinarello, C.A. & Bufler, P. 2014, "Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 7, pp. 2650-2655.
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K. & Nunez, G. 2009, "Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense", *Immunological reviews*, vol. 227, no. 1, pp. 106-128.
- Ghonime, M.G., Shamaa, O.R., Das, S., Eldomany, R.A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., Gavrillin, M.A. & Wewers, M.D. 2014, "Inflammasome priming by lipopolysaccharide is dependent upon ERK signaling and proteasome function", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 192, no. 8, pp. 3881-3888.
- Girvin, A.M., Gordon, K.B., Welsh, C.J., Clipstone, N.A. & Miller, S.D. 2002, "Differential abilities of central nervous system resident endothelial cells and astrocytes to serve as inducible antigen-presenting cells", *Blood*, vol. 99, no. 10, pp. 3692-3701.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J. & Golenbock, D.T. 2008, "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta", *Nature immunology*, vol. 9, no. 8, pp. 857-865.

- Hawkins, B.T. & Davis, T.P. 2005, "The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease", *Pharmacological reviews*, vol. 57, no. 2, pp. 173-185.
- Kawai, T. & Akira, S. 2007, "TLR signaling", *Seminars in immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 24-32.
- Kersse, K., Bertrand, M.J., Lamkanfi, M. & Vandenabeele, P. 2011, "NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 22, no. 5-6, pp. 257-276.
- Lee, H., Lee, S., Cho, I.H. & Lee, S.J. 2013, "Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system", *Current Protein & Peptide Science*, vol. 14, no. 1, pp. 33-42.
- Liang, L., Tan, X., Zhou, Q., Zhu, Y., Tian, Y., Yu, H., Kijlstra, A. & Yang, P. 2013, "IL-1 β triggered by peptidoglycan and lipopolysaccharide through TLR2/4 and ROS-NLRP3 inflammasome-dependent pathways is involved in ocular Behcet's disease", *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 54, no. 1, pp. 402-414.
- Minkiewicz, J., de Rivero Vaccari, J.P. & Keane, R.W. 2013, "Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome", *Glia*, vol. 61, no. 7, pp. 1113-1121.
- Montolio, M., Tellez, N., Biarnes, M., Soler, J. & Montanya, E. 2005, "Short-term culture with the caspase inhibitor z-VAD.fmk reduces beta cell apoptosis in transplanted islets and improves the metabolic outcome of the graft", *Cell transplantation*, vol. 14, no. 1, pp. 59-65.
- Muldoon, L.L., Alvarez, J.I., Begley, D.J., Boado, R.J., Del Zoppo, G.J., Doolittle, N.D., Engelhardt, B., Hallenbeck, J.M., Lonser, R.R., Ohlfest, J.R., Prat, A., Scarpa, M., Smeyne, R.J., Drewes, L.R. & Neuwelt, E.A. 2013, "Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier", *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 33, no. 1, pp. 13-21.
- Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A.E., Fazakas, C., Dung, N.T., Hasko, J. & Krizbai, I.A. 2010, "Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells", *Neurochemistry international*, vol. 57, no. 5, pp. 556-564.
- Prehaud, C., Megret, F., Lafage, M. & Lafon, M. 2005, "Virus infection switches TLR-3-positive human neurons to become strong producers of beta interferon", *Journal of virology*, vol. 79, no. 20, pp. 12893-12904.
- Reimer, T., Shaw, M.H., Franchi, L., Coban, C., Ishii, K.J., Akira, S., Horii, T., Rodriguez, A. & Nunez, G. 2010, "Experimental cerebral malaria progresses independently of the Nlrp3 inflammasome", *European journal of immunology*, vol. 40, no. 3, pp. 764-769.
- Rosenstiel, P., Fantini, M., Brautigam, K., Kuhbacher, T., Waetzig, G.H., Seegert, D. & Schreiber, S. 2003, "TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells", *Gastroenterology*, vol. 124, no. 4, pp. 1001-1009.

- Schroder, K. & Tschopp, J. 2010, "The inflammasomes", *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 821-832.
- Shaw, P.J., Lamkanfi, M. & Kanneganti, T.D. 2010, "NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome", *European journal of immunology*, vol. 40, no. 3, pp. 624-627.
- Stroh, T., Batra, A., Glauben, R., Fedke, I., Erben, U., Kroesen, A., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., Girardin, S., Zeitz, M. & Siegmund, B. 2008, "Nucleotide oligomerization domains 1 and 2: regulation of expression and function in preadipocytes", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 181, no. 5, pp. 3620-3627.
- Sun, J. & Ding, Y. 2012, "NOD2 agonist promotes the production of inflammatory cytokines in VSMC in synergy with TLR2 and TLR4 agonists", *TheScientificWorldJournal*, vol. 2012, pp. 607157.
- Tan, M.S., Tan, L., Jiang, T., Zhu, X.C., Wang, H.F., Jia, C.D. & Yu, J.T. 2014, "Amyloid-beta induces NLRP1-dependent neuronal pyroptosis in models of Alzheimer's disease", *Cell death & disease*, vol. 5, pp. e1382.
- van Heel, D.A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K.A., Lundberg, A.M., Ahmad, T., McGovern, D.P., Onnie, C., Negoro, K., Goldthorpe, S., Foxwell, B.M., Mathew, C.G., Forbes, A., Jewell, D.P. & Playford, R.J. 2005, "Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease", *Lancet*, vol. 365, no. 9473, pp. 1794-1796.
- Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perriere, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., Male, D.K., Roux, F., Greenwood, J., Romero, I.A. & Couraud, P.O. 2005, "Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line", *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 19, no. 13, pp. 1872-1874.
- Wilhelm, I., Fazakas, C. & Krizbai, I.A. 2011, "In vitro models of the blood-brain barrier", *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, vol. 71, no. 1, pp. 113-128.
- Zambetti, L.P. & Mortellaro, A. 2014, "NLRPs, microbiota, and gut homeostasis: unravelling the connection", *The Journal of pathology*, vol. 233, no. 4, pp. 321-330.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönöm

Dr. Krizbai Istvánnak, az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Neurobiológia Kutatóegység tudományos tanácsadójának, témavezetőmnek a munkámhoz nyújtott segítségét, hasznos tanácsait és támogatását;

Prof. Dr. Toldi Józsefnek, az SZTE TTIK Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék tanárának, belső konzulensemnek a támogatását;

Nyúl-Tóth Ádámnak, Dr. Wilhelm Imolának, Fazakas Csillának, Molnár Juditnak és Haskó Jánosnak az MTA SZBK, Biofizikai Intézet, Molekuláris Neurobiológia Kutatóegység tagjainak segítségét, hasznos tanácsaikat és nem utolsósorban a kellemes légkört.

11. Tételes szakmai hozzájárulás

Alulírott, Kozma Mihály a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

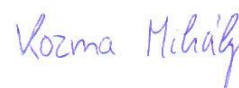
- Real-time PCR reakciókat
- Western-blot-ot

végeztem el, és az

- IL-1 β ELISA-ban

segédkeztem.

2014. december 29.



Kozma Mihály

12. Megjegyzés

Jelen TDK pályamunka a következő kézirat részeredményeit tartalmazza:

Regulation of NOD-like receptors and inflammasome activation in cerebral endothelial cells. Nagyőrszi Péter, Nyúl-Tóth Ádám, Fazakas Csilla, Wilhelm Imola, **Kozma Mihály**, Molnár Judit, Haskó János, Krizbai István A. (J. Neurochem. elbírálás alatt)