

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**AZ ADENOZIN A3 RECEPTOROK ÉS A RETINOIDOK
SZEREPE AZ EFFERO CITÓZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN**

Dr. Joós Gergely

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa



DEBRECENI EGYETEM

Fogorvostudományi Doktori Iskola

Debrecen, 2017

AZ ADENOZIN A3 RECEPTOROK ÉS A RETINOIDOK SZEREPE AZ EFFEROITÓZIS SZABÁLYOZÁSÁBAN

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Joós Gergely, okleveles általános orvos, fogorvos
Készült a Debreceni Egyetem Fogovostudományi doktori iskolája
keretében

Témavezető: Prof. Dr. Szondy Zsuzsa, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szekanecz Zoltán, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem FOK, 201 Szemináriumi szoba
2016.02.05. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Martin Herrmann, DSc

Dr. Lányi Árpád, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Matesz Klára, az MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Gallyas Ferenc, az MTA doktora

Prof. Dr. Márton Ildikó, az MTA doktora

Prof. Dr. Martin Herrmann, DSc

Dr. Lányi Árpád, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épületének tanterme, 2018.01.18. 13 óra

1. BEVEZETÉS

1.1.Efferocitózis: Az apoptótikus sejtek eltakarítása

A legtöbb sejt élete az apoptózisnak vagy programozott sejthalálnak nevezett folyamattal ér véget. Az apoptótikus sejthalállal egy másik alapvető biológiai jelenség veszi kezdetét, mely során az elhalt sejteket az élők gyorsan és hatékonyan eltakarítják. A folyamat, mely során az élő sejtek bekebelezik, majd lebontják az elhaltakat, a fagocitózis speciális formájának minősül, azonban jelentősége és egyedi, specifikus molekuláris jellemzői miatt egyre elterjedtebben külön megnevezéssel efferocitózisnak nevezik (Henson mtsai., 2001). A kifejezés a latin „efferre” igéhez köthető, melynek jelentése: „a sírhoz vinni” ill. „eltemetni”. A fagocitózis tágabb értelemben bármilyen nagyobb, szilárd partikulum (mint például baktériumok, tápanyagok, törmelékek) bekebelezését majd sejten belüli feldolgozását jelenti, míg az efferocitózis specifikusan az apoptótikus sejtek felvételére vonatkozik.

1.2.Az efferocitózis szerepe az egészséges szervezet működésében

Egészséges egyénekben is sejtek milliárdjai halnak el és kerülnek feldolgozásra nap, mint nap (kb. egy millió sejt minden másodpercben) anélkül, hogy gyulladást és immun választ váltanának ki (Hart és mtsai., 2008; Ravichandran 2010). Az apoptótikus sejthalál, a nekrotikussal ellentétben, nem vált ki pro-inflammatorikus választ, aminek alapvető jelentősége van számos élettani folyamatban. Az efferocitózis szoros kapcsolatban áll a gyulladás szabályozásával és a szöveti homeosztázis fenntartásával. Meghatározó szerepe van a szöveti regenerációban (Biancheri és mtsai., 2014) és differenciációban (Sarang és mtsai., 2013). Érdekes módon, bár az efferocitózis testszerte végbemegy, a folyamatot irányító molekuláris mechanizmusok szövetspecifikusak lehetnek (Elliott és mtsai., 2010).

1.3.“Az efferocitózis „végrehajtói”

A legtöbb sejtípus képes elhalt sejtek felvételére. A sejtek egy csoportja azonban, melyeket professzionális fagocitáknak neveznek, hatékonyabban vesz fel elhalt sejteket. Ilyen professzionális “takarítók” a makrofágok, a dendritikus sejtek valamint a neutrophil granulociták (Ravichandran, 2010). Számos tanulmány kimutatta, hogy az efferocitózisért

felelős molekulák (receptorok, jelátvivők, stb.) specifikusak, általánosan elterjedtek és az evolúció során kifejezetten konzerváltak maradtak. Az azonban nem egyértelmű, hogy a különböző sejtípusokban ugyanaz a molekuláris mechanizmus hozható-e kapcsolatba az elhaló sejtek felvételével (Monks és mtsai., 2008): számos bizonyíték támasztja alá, hogy az efferocitózis kapcsolt molekulák sejtípus specifikusak, a különbség azonban inkább a felvétel ütemét semmint kvalitatív differenciát eredményezhet (Parnaik és mtsai., 2000). Más tanulmányok eredményei ezzel szemben arra utalnak, hogy az efferocitózis molekuláris mechanizmusai nem csak evolúciósan de az egyes sejtípusok között is konzerváltak (Monks és mtsai., 2008). Bár az apoptotikus sejtek eltávolítása egyértelműen bekövetkezik makrofágok hiányában is- például az embrionális fejlődés korai időszakában vagy olyan szervekben, melyekben nincsenek makrofágok- a vonatkozó irodalomban uralkodó képzet szerint az apoptotikus sejtek eltakarítása *in vivo* döntően makrofágokhoz köthetően valósul meg (Monks és mtsai., 2008). Sőtmitöbb, az efferocitózissal összefüggésben a legtöbb kísérleti adat rágszáló vagy humán eredetű (perifériás és/vagy csontvelői progenitorokból differenciáltatott) makrofágokkal végzett kísérletekből származik. A disszertáció további részeiben ezért külön említés hiányában az efferocitózis mindig a makrofágok apoptotikus sejtfelvételére vonatkozik.

1.4. Az efferocitózis lépései

Fiziológiás körülmények között az efferocitózis olyan hatékony, hogy még a legnagyobb “sejt-turnover”-rel jellemezhető szövetekben (csontvelő, lép, timusz) is alig lehet apoptotikus sejteket kimutatni. Számos kutató mindezt úgy magyarázza, hogy dinamikus egyensúly állhat fenn az elhaló sejtek száma, az eltakarítást végző fagociták száma valamint azok sejtfelvételi kapacitása között (Gardai és mtsai., 2006; Ravichandran 2010). Mindez arra utal, hogy a sejteltakarítás egy igen precízen szabályozott folyamat. Az efferocitózis szabályozásának ill. az efferocitózis kapacitás “finomhangolásának” megértéséhez a folyamat részlépéseit pontosan meg kell határozni.

Az apoptotikus sejtek eltakarítását alapvetően négy fő lépésre lehet felosztani (Lauber és mtsai., 2004): Először specifikus „find-me” jelek az elhaló sejtek közvetlen közelébe **toborozzák** a fagocitákat (Gregory 2009). Az elhaló sejtek **felismerése** az elhaló sejtek felszínén megjelenő „eat-me” jelek és a fagociták felszínén megtalálható efferocitózis kapcsolt receptorok interakciójának köszönhető. A harmadik lépés az elhalt sejt(ek) bekebelezése, feldolgozása és **megemésztése** (Grimsley és mtsai., 2003). Az ún. „bekebelezés utáni következmények” a

záró mozzanatai az eltakarításnak, melyek magukba foglalják az anti-inflammatorikus citokinek szekréciójának elindulását valamint a pro-inflammatorikus citokinek szintézisének aktív gátlását a fagocitában (Savill és mtsai., 2002).

Az elhaló sejtek oldékony faktorokat bocsátanak ki, melyek a környezetükbe vonzzák a mozgékony fagocitákat. Így az efferocitózis kapacitása azáltal nő, hogy a fő effektor sejtek száma emelkedik. Számos ún. „find-me” szignált sikerült már azonosítani. Ilyen a lysofoszfátidylkolin, a szfingozin-1-foszfát, a fraktalkin vagy az adenosin-trifoszfát (ATP). Az, hogy ezen szignálok mindig jelen vannak-e vagy szintén sejtspecifikusak még nem tisztázott. A makrofágok és neutrofil granulociták mozgása úgy valósul meg, hogy a sejtek elülső pólusán membrán protrúziók (lamellopódiumok) alakulnak ki, valamint ezzel egy időben a hátsó póluson kontrakciók jönnek létre (ciklikus folyamat) (Ridley és mtsai., 2003; Friedl és mtsai., 2008). A sejt vándorlás kezdeti szakaszában a sejt polarizálódik és a fentiek szerint a sejt vezető oldala és rajta a membrán protrúziók, előboltosulások a migrációt kiváltó ágens növekvő koncentrációjának irányába mutatnak (Kamimura és mtsai., 2008; Ridley és mtsai., 2003).

Korábbi neutrofilekkel és makrofágokkal végzett tanulmányok kimutatták, hogy a kemotaktikus hírvivő molekulákon kívül az irányított mozgáshoz szükség van egy autokrin purinerg szignálmechanizmusra is, mely a sejtek vezető oldalán mintegy molekuláris jelerősítő, jelátalakító működik. E szerint a purin nukleotidok nem csak mint elhaló sejtekből kiáramló potenciális „find-me” szignálok játszhatnak szerepet (ahogy azt az ATP vonatkozásában már leírták) az efferocitózis kezdeti szakaszában, hanem a mozgó sejtekből kikerülve, annak sejt felszíni receptoraihoz kötődve a kemotaktikus jelek felerősítésében is közreműködhetnek. A kemotaktikus jel érzékelését követően, a fagociták ATP-t kezdenek kibocsátani a vezető oldalukon, ami extracellulárisan adenosin difoszfátra (ADP), adenosin monofoszfátra (AMP) és adenosinra bomlik. Neutrofilekben az ATP a P2Y2 nukleotid receptorokhoz kötődve a mozgás irányításáért felel, míg az adenosin az adenosin 3 receptorokon (A3R) a mozgás sebességét befolyásolja (Chen és mtsai., 2006). A P2Y2 vagy az A3R-okkal való interferencia erősen gátolja a neutrofilek kemotaktikus mozgását, az A3R-ok teljes hiánya pedig a neutrofil granulociták immun funkcióiájának jelentős romlásához vezet *in vivo* (Butler és mtsai., 2012). Makrofágok vonatkozásában kimutatták, hogy a három purinerg receptor altípus (az ATP receptor P2Y2, az ADP receptor P2Y12 vagy az adenosin receptorok) egyikének/valamelyikének részvétele elégséges, de szükséges a kemotaktikus mozgás létrejöttéhez (Kronlage és mtsai., 2010). Érdekes módon, ezekben a kísérletekben az apyrase (növényi eredetű ATP/ADPáz enzim) az ATP-t egy alternatív degradációs útvonal végén úgy

bontotta le, hogy sem ADP sem adenozin végtermék nem keletkezett. Így apyrase jelenlétében, ligand hiányában egyik purinerg receptor sem tud aktiválódni, aminek következtében a kemotaktikus mozgás jelentősen beszűkül (Kronlage és mtsai., 2010). Mindez magyarázatul szolgál arra is, hogy az apyrase *in vivo* miért késlelteti a makrofágok apoptotikus sejtek irányába történő mozgását (Elliott és mtsai., 2009). Bár néhány szerző kételkedik is az ATP kemoattraktáns szerepét illetően, az elhaló sejtekből kijutó ATP és annak bomlástermékei a fagociták felszínén lezajló purinerg jelerősítés, jelátalakítás révén is részt vehetnek az efferocitózis kapcsolt kemotaktikus mozgás szabályozásában. A négy adenozin receptor mindegyike G-fehérje-kapcsolt receptor (A1R, A2AR, A2BR és A3R). Az egyes receptorok stimulálhatósága az adenozin koncentrációjától és a receptorok sejtfelszíni sűrűségétől, számától függ. A hasüregi makrofágok felszínén az A2AR, A2BR és az A3R receptorok találhatók meg.

Miután a fagociták az elhaló sejtek közvetlen közelébe jutottak, az elhalt sejteket azonosítják (felismerés lépése). Az efferocitózis ezen lépése az elhaló sejtek és a fagociták közötti komplex molekuláris interakció eredménye, amit jelentősége miatt „a harmadik szinapszisnak” is szoktak nevezni (Szondy és mtsai., 2011). Az elhaló sejtek felszínének apoptózis során bekövetkező változása meglehetősen összetett, nem egy bizonyos molekulához kötött. Az ezen változásokat felismerő receptorok a fagociták oldalán ennek megfelelően szintén különbözőek, de ugyanakkor szimultán működnek (Stuart és mtsai., 2005, Ravichandran és mtsai., 2007). A legjobban karakterizált változás, mely az élő sejteket megkülönbözteti az elhaltaktól, a foszfatidilszerin (PS) molekulák megjelenése a sejtmembrán külső felszínén (Fadok és mtsai., 2003). Számos makrofág receptor a PS-hez vagy annak az oxidált formájához közvetlenül vagy hídképző molekulákon keresztül kötődik. A makrofágok mind sejtfelszíni receptorokat, mind hídképző molekulákat szintetizálnak az elhaló sejtek felismerése és felvétele érdekében. Laboratóriumunkban folyó korábbi kutatások kimutatták, hogy a transzglutamináz 2 (TG2) az integrin $\beta 3$ koreceptoraként szerepet játszik az apoptotikus sejtek hatékony felvételében (Tóth és mtsai., 2009). TG2 hiányában az egerekben a szisztémás lupus erythematosus (SLE)-hez hasonló autoimmun tünetek alakulnak ki (Szondy és mtsai., 2003), hasonlóan más olyan egerekhez, melyekben az apoptotikus sejtek eltávolításának defektusa mutatható ki (Tanaka és mtsai., 2007).

A makrofágok változó számú elhalt sejttel találkoznak vándorlásuk közben *in vivo*, amihez képesek effektor molekula készletük megnövelésével rugalmasan alkalmazkodni. Az apoptotikus sejtek felvételének kapacitása ilyen módon molekuláris szinten is szabályozás alatt

áll. Egyre több kísérletes eredmény azt támasztja alá, hogy a bekebelezett apoptotikus sejtek mennyiségének érzékeléséért és a makrofágok efferocitózis kapacitásának növeléséért sejten belül a liver X receptorok (LXR) (A-Gonzalez és mtsai., 2009), a peroxisome proliferator-aktivált receptor (PPAR) γ (Roszer és mtsai., 2011) és δ (Mukundan és mtsai., 2009) receptorok a felelősek. Miután lipid ligandjaik triggerelik őket, fokozzák a fagocita receptorok és a hídképző molekulák kifejeződését. A lipid érzékelő receptorok a magreceptorok retinoid x receptor (RXR)-heterodimerek családjába tartoznak. Közös jellemzőjük, hogy egyaránt aktiválhatóak a különböző lipid származékok által az LXR vagy PPAR oldalról illetve az A vitamin (retinol) különböző biológiailag aktív származékai, a retinoidok által az RXR oldalról (ezért a receptorokat rexinoidoknak vagy permisszív RXR heterodimereknek is nevezik) (Mangelsdorf és mtsai., 1995, Tzameli és mtsai., 2003). Az élő szövetekben a természetes RXR ligand azt valószínűsítik, hogy a 9-cisz retinsav lehet (9cRA), ami a csupa-transz retinsavból (ATRA) egy nem enzimatis reakció során jön létre (Heyman és mtsai., 1992). Az ATRA a retinol két dehidrogenálási lépés során keletkező oxidált módosult (Kam és mtsai., 2012). Érdekes módon azonban, a 9cRA-t *in vivo* még nem tudták kimutatni (Rühl, 2006). A lipid érzékelő RXR-heterodimer receptorokon kívül az ATRA és a 9cRA a retinsav receptorokat (RAR-ok) is aktiválják. A RAR/RXR receptorok, a lipid érzékelő receptoroktól eltérően, nem aktiválhatóak kizárólag az RXR oldalról (ezért non-permisszív RXR receptoroknak is nevezik őket) (Germain és mtsai., 2006, Tzameli és mtsai., 2003). A ligálást követően, a lipid érzékelő receptorok számos olyan gén transzkripcióját szabályozzák, melyek fontos szerepet játszanak a lipid homeosztázis irányításában (Calkin és mtsai., 2012). Ilyen közvetlen LXR szabályozás alatt álló gén az SREBP-1c (Yoshikawa és mtsai., 2001) illetve a RAR α (Rébé és mtsai., 2009), melyek kifejeződését a promóterükben lévő LXR kötőhelyekhez csatlakozva irányít az aktivált LXR receptor. Két efferocitózis- kapcsolt gén- az ABCA1 és a Mer tirozin kináz (Mertk)- is közvetlen LXR célgénnek bizonyult. Magában az LXR gén promóterében is találhatóak LXR kötőhelyek, így valószínűsíthető, hogy a ligációt követően az LXR önmaga transzkripcióját is szabályozhatja egy autoregulációs mechanizmus révén (Li és mtsai., 2002). Kutatócsoportunkban folyó korábbi kutatások azt igazolták, hogy a timociták *in vivo* apoptózis indukcióját követően fokozott retinoid képződés figyelhető meg a timuszban. Érdekes módon a retinsav szintéziséért felelős retinaldehid dehidrogenáz (RALDH) enzimeket kifejező sejtek nem a timociták, hanem az elhaló timocitákat bekebelező makrofágok. *In vitro* eredményeink szerint az apoptotikus sejt felvétel után ill. az LXR szintetikus agonistákkal történő aktivációját

követően a makrofágok RALDH kifejeződése fokozódik, ami arra utal, hogy az apoptotikus sejt felvétel retinoid szintézissel kapcsolt folyamat (Garabuczi és mtsai., 2013).

Miután az efferocitózis receptorok érzékelik az apoptotikus sejtek „eat.me” jeleit, két jelátviteli útvonal aktivációja vezet az elhalt sejt bekebelezéséhez szükséges citoskeletális átrendeződéshez. Mindkét útvonal a kis GTPáz Rac1 aktivációjába konvergál. A Rac1 aktiváció az actin filamentumok átrendeződéséhez és a „fagocita csésze” kialakulásához vezet (Nagata és mtsai., 2010). Másfelől a RhoA aktiváció, ami egy másik kis GTPáz, gátolja ugyanezt a folyamatot. A Rac1 és a RhoA aktiváció közötti relatív egyensúly meghatározza a makrofág efferocitózis hatékonyságát (Nakaya és mtsai., 2006). Az apoptotikus testecskék bekebelezését követő további eseményeket összefoglalóan fagoszóma „érésnek” nevezik. A fagoszóma egy membránnal határolt kompartment a sejten belül, mely tartalmazza a bekebelezett partikulumokat, sejt-törmelékeket. Az „érés” során a fagoszóma pH-ja egyre savasabb irányba tolódik, majd végül lizoszomákkal fúzionál, melyek a felvett anyagok lebontásához szükséges bontóenzimeket tartalmazzák (Hochreiter-Hufford és mtsai., 2013).

Az apoptotikus sejthalál egyik legfőbb jellegzetessége, hogy a nekrotikus sejthalállal ellentétben tolerogén természetű, azaz nekrozisnál megfigyelhető gyulladás és immunaktiváció elmarad. Általánosan elfogadott, hogy míg a nekrotikus sejt-törmelékek vagy a patogének felvétele gyulladásához kapcsolt folyamatokat indít el, addig az apoptotikus sejt felvétel *in vitro* és *in vivo* is immunológiai „csendes” folyamat. Bizonyított, hogy mindez immunszuppresszív folyamatok aktív aktivációjával áll kapcsolatban, melyek között pro-inflammatorikus citokinek szintézisének gátlása mellett anti-inflammatorikus hatású anyagok szekréciójának fokozása is megfigyelhető (Fadok és mtsai., 1998). Érdekes módon az adenzin és az adenzin receptorokhoz kapcsolt jelátviteli folyamatok nemcsak a fagociták kemotaktikus migrációjában lehetnek fontosak, hanem az apoptotikus sejt felvétel immunszuppresszív jellegének biztosításában is. Széles körben ismert, hogy bizonyos purin nukleotidok erős hatást képesek kifejteni különféle immunfolyamatokra. Ezek közül a legtöbbet az adenzinről tudunk, melynek az immunfolyamatok számos lépésében fontos szabályozó szerepe van (Haskó és mtsai., 2007). Korábbi laborunkban folyó tanulmányok bizonyították, hogy az adenzin a makrofágok felszínén jelenlévő 5' nukleotidázhoz köthetően keletkezik az apoptotikus sejtekkel történő interakció során (Sandor és mtsai., 2016). Köröskényi Krisztina és munkatársai feltárták, hogy az A2AR a makrofág inflammatory protein-2 (MIP-2) szintézisének gátlásán keresztül immunszuppresszív hatást fejt ki az efferocitózis során (Köröskényi és mtsai., 2011), míg az A3R-nak épp ellenkező hatása lehet (Dúró és mtsai., 2014).

1.5. Az elhalt sejtek eltávolításának zavara

Egészséges szövetekben az elhaló sejtek és az elhalt sejteket eltakarító fagociták száma valamint azok fagocitózis kapacitása között finoman szabályozott egyensúly áll fenn. Ennek eredményeképp az efferocitózis olyan hatékony, hogy még a legnagyobb sejt-turnover-rel jellemezhető szövetekben sem mutatható ki, csak elenyésző számú apoptotikus sejt. A folyamat zavara esetén az apoptotikus sejtek szekunder nekrozison mennek keresztül, pro-inflammatórikus hatású sejttermeléik környezetükbe jutnak, amik gyulladásához és következményes szöveti károsodáshoz vezet. Fontos megjegyezni, hogy az apoptotikus sejtek felvétele anti-inflammatórikus folyamatokat indít, melyek elmaradása zavart efferocitózis esetében valószínűleg hozzájárul az elhaló sejtek zavart eltávolításának proinflammatorikus jellegéhez továbbá pathológiás következményeihez. Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az elhalt sejtek eltávolításának zavara, akár öröklött akár szerzett anomáliákkal áll összefüggésben, számos humán betegség kialakulásához járul hozzá az immunregulációra, szöveti homeosztázisra és reparációs folyamatokra gyakorolt hatása révén (Elliot és mtsai., 2010). Másfelől, az elhalt sejtek zavartalan eltakarítása fontos lépés a sérüléseket követő szöveti regenerációs-reparációs folyamatokban (Wan és mtsai., 2013) és kulcsfontosságú a gyulladás rezolúciós fázisában (Savill és mtsai., 2002).

Az efferocitózis zavara és a betegségek kapcsolata az egyes autoimmun kórképek tekintetében vált a leginkább ismertté. Egyes autoimmun folyamatok vonatkozásában állat és humán vonalon végzett kísérletek és tanulmányok is azt támasztják alá, hogy az adott kórállapot kialakulása és az efferocitózis zavara között szoros összefüggés van. A legtöbb knock out egértörzsben, melyben megfigyelhető az efferocitózis zavara, a szisztémás lupus erythematosus hoz (SLE) tüneteirehöz hasonló autoimmun tünetek alakulnak ki (Hanayama és mtsai., 2004; Scott és mtsai., 2001; Botto és mtsai., 1998; Szondy és mtsai., 2003; Lewis és mtsai., 2006). A humán SLE kapcsán szintén igazolt az elhaló sejtek eltávolításának zavara (Muñoz és mtsai., 2010), továbbá bizonyítottan állhat a fagocitózis genetikailag meghatározott defektusa a betegség manifesztációjának hátterében (Lewis és mtsai., 2006). Az SLE-n kívül azonban számos más pathológiás állapot is összefüggésben lehet az efferocitózis zavarával. A teljesség igénye nélkül néhány ezek közül: tüdő és légúti kórképek (COPD, asztma és a cisztikus fibrózis) (Henson és mtsai., 2008), atheroszklerózis (Seimon és mtsai., 2009), neurodegeneratív betegségek (Parkinson-, Alzheimer- és Huntington-kór) (Mattson és mtsai., 2000), a 2-es típusú

diabétesz és az obezitás (O'brien és mtsai., 2002; Li és mtsai., 2009) valamint a krónikus fogágybetegség (parodontitisz) (Joós G., 2015).

Fontos lenne tisztázni és megérteni ezen betegségek hátterét, hiszen a sejteltakarítás esetleges befolyásolása révén új terápiás lehetőségek válhatnak elérhetővé (Ravichandran, 2010). A fagocitózis hatékonyabbá tétele kedvező hatást válthat ki az ilyen betegségek lefolyására, progressziójára.

Több eredményes próbálkozásról, ígéretes tanulmányról számoltak már be a témában, jóllehet a legtöbb még kísérleti stádiumban tart. Ilyen például az apoptotikus sejtek fagociták általi felismerésének elősegítése illetve az efferocitózis kapcsolt lipid érzékelő magreceptorok aktiválása. Utóbbi a fagocita receptorok és hídképző molekulák kifejeződésének fokozása révén vezethet az efferocitózis kapacitásának növekedéséhez. A Rac-1/RhoA egyensúly befolyásolása vagy a sejtmembrán lipidösszetételének megváltoztatása szintén reményteli új távlatokat nyithat ma még gyógyíthatatlannak vélt betegségek kezelésében (Szondy és mtsai., 2014).

2. CÉLKITŰZÉSEK

- I. Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy a kemotaktikus szignálok mellett az autokrin purinerg jelátvitel is fontos szerepet játszik abban, hogy a makrofágok irányított mozgásba kezdjenek az efferocitózis során (Kronlage és mtsai., 2010). Mindebben az egyes adenoszin receptorok pontos szerepe még nem tisztázott. Első célunk ezért az volt, hogy:
 - létrehozzunk egy *in vitro* kísérleti rendszert, melyben a makrofágok apoptótikus sejtek irányába történő mozgása tanulmányozható
 - *in vitro* és *in vivo* vizsgáljuk az A3 receptorok szerepét a makrofágok apoptótikus timociták irányába történő mozgása során

- II. Laboratóriumunkban végzett korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a TG2 az integrin $\beta 3$ koreceptoraként részt vesz az elhaló sejtek felismerésében és bekebelezésében (Tóth és mtsai., 2009). A TG2 egy retinoidok által szabályozott gén (Moore és mtsai., 1984), míg az LXR stimuláció a retinoid szintézist fokozza a makrofágokban (Garabuczi és mtsai., 2013). Kísérleteim második részében azt vizsgáltam, hogy:
 - az LXR receptorok stimulációja milyen úton vezet a makrofágok fokozott retinoid termeléséhez
 - az LXR indukált retinoid produkció hozzájárul-e az efferocitózis kapacitás LXR stimulációt követően tapasztalható növekedéséhez
 - mi okozza a retinoidok az efferocitózis-fokozó hatását
 - mi az a konkrét retinoid, melynek termelése együtt jár a timuszban zajló apoptózist követő efferocitózissal

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Reagensek

A kísérletek során felhasznált reagenseket a Sigma-Aldrich-től (Budapest, Hungary) szereztük be, illetve az ettől eltérő forrásból származókat külön feltüntettem.

3.2. Kísérleti állatok

A kísérleteket 4 hetes illetve 2-4 hónapos C57BL/6 és FVB (vad típusú/WT) egereken végeztük. Az A2AR, A3R, TG2 vagy CD14 elvesztésének efferocitózisra kifejtett hatását A2AR^{-/-} (Ledent és mtsai., 1997), A3R^{-/-} (Lee és mtsai., 2003), TG2^{-/-} (Szondy és mtsai., 2003) és CD14^{-/-} (Devitt és mtsai., 2004) egerekből származó makrofágokon tanulmányoztuk. Az *in vivo* retinoid termelés vizsgálatát RARE-hsp68-lacZ riporter-transzgén egerek segítségével végeztük (Rossant és mtsai., 1991). A kísérleti állatok a Debreceni Egyetem Élettudományi Központjában lévő Állatházban a vonatkozó előírásoknak megfelelő körülmények között voltak tenyésztve és gondozva. A timociták és makrofágok izolálását megelőzően az egereket éter narkózisban áldoztuk fel. Minden kísérlet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) engedélyével zajlott.

3.3. Hasüregi makrofágok izolálása és tenyésztése az *in vitro* kemotaxis esszéket megelőzően

A makrofágokat 2-4 hónapos egerekből, steril fiziológiás sóoldattal történő hasüregi mosással nyertük. 2×10^5 sejtet 10% FBS-t, 2 mM glutamint, 1 mM Na-piruvátot, 100U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó RPMI 1640 médiumban 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében 20 mm átmérőjű üvegaljű sejtenyésztő edényekben (In Vitro Scientific, Sunnyvale, California, USA) tenyésztettünk. 4h inkubációt követően a ki nem tapadt sejteket lemostuk. A letapadt sejteket 1 napon át tenyésztettük, majd közvetlenül az *in vitro* kemotaxis kísérletek megkezdése előtt a tápoldathoz adtuk az apyrase-t és/vagy az adott adenosin receptor agonistát vagy antagonistát tartalmazó tápoldatot. Mivel valamennyi adenosin receptor agonista és antagonista DMSO- ban volt feloldva, a DMSO minden sejtkultúrában 0,5 v/v%- ban a tápoldatba lett keverve. A rezidens hasüregi makrofágok apoptotikus timociták irányába történő vándorlásának *in vitro* tanulmányozásához apoptotikus timocitákat hoztunk létre, 18h-n keresztül tartó 1 µM dexamethasone (Dex) expozícióval, melynek hatására a sejtek >70 %

Annexin V pozitívvá váltak. A kemotaktikus migráció kiváltásához egy 6×10^6 apoptotikus sejtet tartalmazó Whatman GF/C szűrőpapír korongot helyeztünk a tenyésztőedény közepére. Így a $0,7 \mu\text{m}$ -nél kisebb apoptotikus timocita eredetű “find-me” molekulák (szignálok) ki tudtak áramlani a tápoldatba a szűrőpapíron keresztül, de a sejtek a szűrőpapírban maradtak, biztosítva a kemotaxisához szükséges gradiens létrejöttét. A gradiens fenntartásához a sejteket tartalmazó szűrőpapírt egy 12 mm átmérőjű VWR Mikroszkóp fedőlemezzel fedtük le. A makrofágok kemotaktikus mozgását 5h-n keresztül követtük nyomon a tenyésztőedény Whatman GF/C szűrőpapír körüli, illetve VWR Mikroszkóp fedőlemezzel fedett területén. A mikroszkópok látótere minden tenyésztőedényen 25-30 makrofág mozgásának egyidejű megfigyelését tette lehetővé.

3.4. Csontvelői makrofágok (BMDM) tenyésztése és kezelése

A csontvelői progenitorokat 2-4 hónapos egerek combcsontjának steril fiziológiás sóoldattal történő átmosásával nyertük. A sejteket 6 napon keresztül differenciáltattuk 10% FBS-t, 10% L929 sejt kultúrából származó kondicionált médiumot, 2mM glutamint, 100 U/ml penicillint és 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycint tartalmazó DMEM tápoldatban, 37 °C-on 5% CO₂ jelenlétében. A nem letapadt sejtek minden második nap le lettek mosva. A csontvelői makrofágokat 1 μM GW3965 (Glaxo Smith Kline, Budapest, Hungary), szintetikus LXR agonista, 1 μM LG268 (John Schwabe szívélyes ajándéka, University of Leicester), szintetikus RXR agonista, 1 μM AM580 (Tocris Bioscience), szintetikus pan RAR agonista, 500 nM AGN193109, egy pan RAR antagonist, 300 nM ATRA, természetes pan RAR agonista vagy 300 nM 9cRA, egy természetes RXR és RAR agonista jelenlétében a jelzett ideig tenyésztettük. Egyes kísérletekben 25 μM DEAB (diethylaminobenzaldehyde)-ot használtunk az aldehid dehidrogenáz enzim gátlására.

3.5. Timocita apoptózis indukció *in vivo* és kapcsolódó mérések

4 hetes C57BL/6 egereket 22 $\mu\text{g/ttg}$ DMSO-ban oldott Dex-nal (vagy DMSO-fiziológiás só oldattal a kontroll kísérletekhez) intraperitoneálisan oltottunk. Ezt követően a megadott időpontokban az egereket feláldoztuk, majd a timuszukat izoláltuk. A timusz lebenyek tisztítása után timocita sejtsuszpenziót készítettünk. A sejtszámlálást követően, a timocitákat Alexa Fluor 647 festékkel konjugált Annexin V (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)- tel festettük az apoptotikus sejtek számának meghatározásához. A megfestett sejteket Becton Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences) ill. Flowing 2.5 szoftver segítségével

analizáltuk. Más kísérletekben a timusz izolálást követően a lebenyeket fixáltuk majd előkészítettük további immunhisztokémiai festéshez illetve gén expressziós vizsgálatokhoz.

3.6. Timocita apoptózis indukció *in vitro*

Timocitákat izoláltunk 4 hetes vad típusú vagy A3R hiányos egerekből. A timusz lebenyekből sejtszuspenziót készítettünk 10% FBS-t, 2 mM glutamint, 100U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint tartalmazó RPMI 1640 médiumban. A timocitákat háromszor átmostuk és 10^7 sejt/ml koncentrációban 1 µM Dex jelenlétében 37 °C –on 5% CO₂ jelenlétében a jelzett ideig inkubáltuk. A tenyésztés végén az elhalt sejtek aránya propidium jodid/annexin V-FITC festést követően lett meghatározva. A megfestett sejteket Becton Dickinson FACSCalibur (BD Biosciences) ill. Flowing 2.5 szoftver segítségével analizáltuk. A hasüregi *in vivo* fagocitózis kísérletekhez vad típusú timocitákat CellTracker Deep Red Dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) festékkel festettünk az apoptózis indukció során. A sejtek 2 µM Dex jelenlétében 6h alatt >60%- ban apoptózis révén haltak el. A tenyésztés végén a sejtek háromszor lettek átmosva fiziológias sóoldattal, majd a jelzett számú apoptotikus sejtet, 500 µl fiziológias sóoldatban felvéve, a hasüregbe injektáltunk.

3.7. Kemotaxis esszék

Videómikroszkópos kísérleteink 4 db Olympus (Tokyo, Japan) mikroszkóp segítségével végeztük melyek egy egyedileg átalakított SANYO MCO18-AC (Wood Dale, IL, US) CO₂ inkubátorban kerültek elhelyezésre. A mikroszkópokhoz csatlakoztatva volt 4 db egyforma 2.0 megapixeles DigiMicro USB 2.0 digitális mikroszkóp kamera. Mind a mikroszkópok, mind a kamerák úgy lettek átalakítva, hogy a sejtek mozgásának detektálása illetve annak rögzítése során, azokat minimális hő- illetve fénykárosodás érje. A time-lapse képrögzítés során a sejtekről 5 órán keresztül minden percben egy felvétel készült az eTox Long Term Scan rendszer és eTox LTS szoftver segítségével. Az így készült képszekvenciákat az ImageJ programban elemeztük (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/install/windows.html>). A képfeldolgozás során a sejtek mozgásának pályáit bináris képszekvenciákká alakítottuk. Ezt követően a sejtek pályáit egy közös kiindulóponttra helyeztük, majd meghatároztuk a sejtek mozgásának közös vektorát, mely egybe esik a kemotaktikus gradiens irányával. Ezt követően valamennyi sejt pályáját elemeztük és kiszámoltuk a közös vektor irányába megtett útjuk hosszát. A kemotaktikus mozgás karakterizálására a sejtek mozgásának sebessége (velocitás) mellett, meghatároztunk egy kemotaxis index értéket is, mely megadja a sejtek gradiens irányú elmozdulásának arányát az akkumulált elmozdulásokhoz képest.

3.8. Hasüregbe fecskendezett apoptotikus timociták fagocitózisa

3 hónapos hím vad típusú és A3R hiányos egerek hasüregébe különböző számú előzetesen CellTracker Deep Red festékkel megjelölt és 500 µl steril fiziológiás sóoldatban felvett apoptotikus timocitát fecskendeztünk (lásd 3.6.). 30 perccel később a hasüregi makrofágokat fiziológiás sóoldattal kimostuk a hasüregből. A sejteket 200 µl 2% -os paraformaldehidben fixáltuk és 4 °C-on 10 percig hűtöttük. Ezt után a sejteket centrifugáltuk majd blokkolás után (50 µl 50% BSA blokkoló pufferoldatban) FITC jelölt anti-F4/80 antitesttel jelöltük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Az így megjelölt sejteket FACSCalibur (BD Biosciences) és Flowing 2.5 szoftver segítségével analizáltuk.

3.9. Immunhisztokémia

A timusz lebenyeket Sainte-Marie oldatban 24 órán át fixáltuk. Ezt követően a mintákat felszálló alkohol sorban és xilolban dehidráltuk majd paraffinba ágyasztuk. 4-6 µm vastagságú metszeteket készítettünk, melyeken 6%-os H₂O₂ segítségével 7 percig blokkoltuk az endogén peroxidáz aktivitást. 1%-os BSA-val 30 perces szobahőmérsékleten történő blokkolást követően anti-F4/80 antitesttel (Abcam, Cambridge, UK (ab6640) egy éjszakán át festettük a mintákat (1:200 hígításban 4 °C-on). Szekunder antitestként anti-patkány antitesteket használtunk (30 perces 1:400 hígításban, szobahőn). Mosást követően Vectastain Elite ABC (avidin-biotin complex) Kit-et (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, UK) használtunk 1:100 hígításban a másodlagos antitestek megjelölésére. A festési protokoll kontrolljaként a primer antitestek helyett PBS (phosphate-buffered saline) használtunk. Az ABC di-amino-benzidine módszerrel lett vizualizálva a konvencionális fénymikroszkópos vizsgálhatóság céljából. A kontroll metszeten specifikus szignál nem volt detektálható. A mintákat dimethylmethylen-kék festékkel is megfestettük a timusz kéreg-velő határának láthatóvá tétele céljából. 24 bites RGB épeket készítettünk a metszetekről amit ezután az ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/install/windows.html>) programmal elemeztünk. Minden mintából 6 identikus látóteret kiválasztottunk a további analízisre. A makrofágok számának arányában lehetett barna színt detektálni a képeken. A timusz medulláris (M), corticomedulláris (CM) és subcapsularis (SC) régióit a 'Versatile Wand Tool' segítségével különítettük el. A barnán festődő immunopozitív makrofágokat valamennyi látótérben külön külön a M, CM és SC régiókban megszámoltuk.

3.10. *In vitro* apoptotikus sejt fagocitózis

Csontvelői makrofágokat 24 órán át 5 μ M CellTracker™ Orange (CMTMR, Invitrogen) festékkel festettünk. Az apoptotikus timocitákhoz 4 hetes C57BL/6 egerek timuszából timocita sejt kultúrát készítettünk (10^7 sejt/ml RPMI 1640 tápfolyadék) melyet 24 órán át szérummentes tápfolyadékban tartottunk fenn (2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin) az utolsó órában 10 μ M carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE, Invitrogen) hozzáadásával. A CFDA festett apoptotikus timociták 10:1 (apoptotikus sejtek:makrofágok) arányban lettek 30 percre a csontvelői makrofágokhoz adva. 30 percnyi inkubáció után az apoptotikus sejteket lemostuk, majd a makrofágokat tripszinnel leválasztottuk a tenyésztőedény aljáról. Ezt követően a sejteket Becton Dickinson FACSCalibur és Flowing 2.5 szoftver segítségével elemeztük.

3.11. A RAR-t aktiváló retinoid származékok *in vivo* termelésének mérése

A RAR aktiváló retinoid származékok *in vivo* termelésének méréséhez RARE-hsp68-lacZ reporter transzgén egereket 20 mg/kg GW3965-tel ill. kontrollként DMSO-val intraperitonealisan oltottunk. 24 órával később, a hasüregi sejteket peritoneális lavage-zsal kimostuk. A sejteket 3 órán keresztül hagytuk kitapadni a tenyésztőedényben, a le nem tapadt sejteket lemostuk. Az adherens sejteket 0.25 mM glutaraldehiddel 5 percig jégen fixáltuk. A fixált sejteket 24 órán keresztül 37 °C-on X-gal festő oldatban inkubáltuk (35 mM kálium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 0.02% Nonidet P-40, 1 mg/ml X-gal). Az így megfestett sejtekről egy AMG EVOS inverz mikroszkóppal x20 nagyításon képeket készítettünk.

3.12. Az mRNS kifejeződés vizsgálata

A csontvelői makrofágokból, timusz mintákból és a RARE-hsp68-lacZ reporter transzgén egerek hasüregi sejteiből total RNS-t izoláltunk TRI reagens felhasználásával, majd az RNS mintákat átírtuk cDNS könyvtárakba a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Budapest, Hungary) segítségével, a gyártó protokollja szerint. A mintákból triplikátumokat készítettünk és qRT-PCR méréseket végeztünk előre tervezett FAM-jelölt MGB esszék (Life Technologies, Budapest, Hungary) ill. egy Roche LightCycler LC 480 real-time PCR készülék segítségével. A lacZ mRNA kimutatásához az alábbi primereket és FAM-TAMRA-jelölt TaqMan próbákat (Eurogentec, Seraing, Belgium) használtuk: forward, 5'-TGC-CGT-CTG-AAT-TTG-ACC-TGA-G-3'; reverse, 5'-CCG-CCA-CATATC-CTG-ATC-TTC-C-3'; probe, FAM-ACT-CCA-ACG-CAG-CAC-CAT-CAC-CGCTAMRA. A relatív

mRNS mennyiségeket az összehasonlító CT módszerrel számoltuk ki, amit a glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNS mennyiségekre normalizáltunk.

3.13. Western blot analízis

A csontvelői makrofágokat 0.5% Triton X-100-t tartalmazó jéghideg lízis puffer oldatban homogenizáltuk. A minták fehérje koncentrációját 2 mg/ml-re hígítottuk, majd egyenlő térfogatú Laemmli puffer oldatban felforraltuk. Az elektroforézist 10%-os SDS-poliakrilamid gélben végeztük. A szétválasztott fehérjéket Immobilion-P transfer membránra (Millipore, Budapest, Hungary) vittük át, melyen anti- LXR α/β (ABGENT), anti- GAPDH és anti- β -actin (Sigma-Aldrich, Budapest) antitestek valamint Immobilon Western Chemiluminescent HRP szubsztrát felhasználásával (Millipore, Budapest, Hungary) detektáltuk őket.

3.14. Immunfluoreszcens festés és konfokális mikroszkópia

A vad típusú csontvelői progenitorokat 8 lyukú tenyésztőedényben (5×10^5 sejt/lyuk) 6 napon keresztül tenyésztettük, differenciáltattuk. A fagocitózis esszéket a fent leírtaknak megfelelően végeztük. Miután a makrofágok és az apoptotikus timociták 30 percen keresztül egy térben voltak, a fel nem vett sejteket lemostuk majd a kitapadt sejteket 4%-os paraformaldehid-del fixáltuk. Az integrin $\beta 3$ és CD14 festéshez, a fixált sejteket először 50%-os FBS-sel 30 percig 37°C-on blokkoltuk, majd jéghideg HEPES pufferrel lemostuk és PE-conjugált anti- $\beta 3$ integrin (BD Biosciences) vagy FITC-conjugált anti-CD14 (BD Biosciences) antitestekkel 15 percig jégen festettük. A megfestett sejtekről a képeket egy Zeiss LSM 510 és egy Olympus FV1000 konfokális lézer scanning mikroszkóppal készítettük.

3.15. LXR receptor elcsendesítés

Az 5 napon át differenciáltatott csontvelői makrofágokat TransIT-siQUEST® transzekciós reagenssel (Mirus Bio LLC) transzfektáltunk a felhasználói útmutató szerint. Röviden: csontvelői makrofágokat 1.5×10^6 BMDM/lyuk koncentrációban egy 6-os plate-en tenyésztettünk 1,25 ml DMEM médiumban (10% FBS, 10% L929 sejtek kondicionált médiuma, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin). A transzekciós koktél 250 μ l OptiMem, 6 μ l TransITsiQUEST reagenst és 37.5 μ l (1 μ M) scrambled vagy LXR α és β specifikus siRNS-t tartalmazott és a sejtekre lett cseppentve. A médiumot a transzekciót követő 3 óra elteltével teljes DMEM médiumra cseréltük.

3.16. Retinoid mérés HPLC-MS-MS technikával

4 hetes C57B6 egereket intraperitoneális oltással 0,3 mg Dex-nal, Dex-nal és DEAB-bal (0,24 mg/ttg) vagy az oldószerrel DMSO-val (kontroll) kezeltünk. 24 órával később az egerek timuszát sötétben eltávolítottuk, majd folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk. A timuszokban a retinsav koncentrációkat HPLC-MS-MS módszerrel (Rühl, 2006) határoztuk meg. Összefoglalva, a timusz mintákból 100 mg-t (amennyiben a minta teljes tömege kevesebb volt 100 mg-nál vízzel egészítettük ki, hogy minden minta tömege egységesen 100 mg legyen) 300 mg isopropanolban feloldottunk. A szövetdarabokat előzetesen feldaraboltuk, majd az oldatot 10 mp-ig vortexeltük, 5 percig ultrahanggal kezeltük, 6 percig ráztuk, majd 13000 rpm fordulaton egy Heraeus BIOFUGE Fresco készülékkel +4°C-on centrifugáltuk. A centrifugálást követően a felülúszókat egy Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Germany) készülékben 30°C-on szárítottuk. A kiszárított felülúszó extraktumokat 60 µl methanolban újra feloldottuk, vortexeltük, majd kihígítottuk 40 µl 60 mM-os ammónium acetát oldattal. Végül egy HPLC-MS-MS berendezéssel elemeztük az így készült mintákat. Az MS-MS készülékünk single ion recording módba (SIR) állítva, 303 m/z jelek relatív intenzitására is fókuszáltuk, mivel nem zártuk ki új, eddig nem azonosított di-hidro-retinsav származékok jelenlétét a mintákban, ahogy azt már korábban együttműködő partnereink leírták (Aydemir és mtsai., 2013). A relatív retinoid koncentrációkat “area under the curve” (AUC) (görbe alatti terület) formájában adtuk meg, amit a timusz tömegekre normalizáltunk.

3.17. Statisztikai analízis

A bemutatott eredmények legalább három, eltérő napon végzett, független kísérlet adatait mutatják be, melyeknél a szignifikanciát kétszélű, nem egyenlő varianciájú Student-féle t-próbával adtuk meg ($p < 0.05$). Az értékek átlag $\pm$ SD-ban vannak kifejezve. A statisztikai számításokat a GraphPad Prism 6 szoftver segítségével végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az Adenozin A3 receptorok szerepe az apoptótikus sejtek eltávolításában

Az adenozin receptor signaling befolyásolja a makrofágok *in vitro* kemotaktikus vándorlását az apoptótikus sejtek irányába

A makrofágok az apoptótikus timocitákból származó find-me szignálok hatására purinerg jelátvitel függő kemotaktikus mozgásba kezdenek, valamint nő a mozgásuk sebessége

A vad típusú egerekből izolált hasüregi makrofágok apoptótikus sejtek jelenlétében határozott mozgásba kezdtek az elhalt sejtek irányába, aminek az átlagsebessége $0.3 \pm 0.19 \mu\text{m}/\text{perc}$ volt. Míg apoptótikus sejtek hiányában, RPMI médiumban, a makrofágok random mozgást végeztek (kemotaxis index 0.12 ± 0.07), addig elhalt sejtek jelenlétében a kemotaxis index 0.55 ± 0.2 -re emelkedett és a velocitás is 25%-kal emelkedett. A sejtek apyráz jelenlétében elvesztették kemotaktikus mozgásuk irányítottságát, ami összhangban áll korábbi közlemények eredményeivel (Kronlage és mtsai., 2010). Ezen tanulmányokkal, ahol a complement C5 által kiváltott mozgást elemezték, némileg ellentétben, mi azt találtuk, hogy apyráz jelenlétében a mozgás sebessége is jelentősen csökken. Adataink, az apoptótikus sejtekből származó “find-me” szignálok kontextusában, alátámasztják azon korábbi eredményeket, melyek arra utalnak, hogy a purinerg receptorokhoz köthető jelátvitelnek a kemotaktikus jelek felerősítésében, feldolgozásában és direkcionális mozgássá alakításában van szerepe.

Az A3R jelátvitel elvesztése megzavarja a makrofágok apoptótikus timociták irányába történő mozgását

Úgy döntöttünk, hogy tovább elemezzük a jelenséget és megvizsgáljuk, hogy a különböző adenozin receptorok miképp járulnak hozzá a makrofágok kemotaktikus migrációjának szabályozásához. Kísérleteket végeztünk adenozin receptor hiányos valamint specifikus adenozin receptor antagonistákkal kezelt vad típusú makrofágokkal. Elemeztük az apoptótikus timociták jelenlétében A2AR $-/-$ (Ledent és mtsai., 1997) és A3R $-/-$ (Lee és mtsai., 2003) egerek hasüregi makrofágjainak mozgását. Mivel ezen k.o. egértörzseket eltérő genetikai háttérű egértörzsekből hozták létre, első kísérleteinkben összehasonlítottuk különbözik-e a vad típusú FVB és C57Bl/6 egerekből származó makrofágok mozgása, de nem találtunk eltérést. Míg az egyes adenozin receptorok elvesztése vagy gátlása nem befolyásolta a makrofágok

mozgását apoptótikus „find-me” szignálok hiányában, apoptótikus timociták jelenlétében az A2AR elvesztése a makrofágok elhaló sejtek irányába végzett mozgásának sebességét kb. 30%-kal csökkentette. Ráadásul az A2AR hiányos makrofágok részben, az A3R hiányos makrofágok pedig teljesen elveszítették kemotaktikus navigációs képességüket. A mozgás irányultságának A3R hiányában tapasztalható elvesztése nem a sejtek differenciálódása során bekövetkező esetleges változással áll kapcsolatban, mivel hasonló hatást eredményezett vad típusú makrofágokon az A3R antagonist MRS3777 alkalmazása is. Az A2BR-ok szerepének vizsgálata céljából egy A2BR antagonist, MRS 1754 jelenlétében is végeztünk vizsgálatokat vad típusú makrofágokkal. Az A2BR gátlása szintén a kemotaktikus orientáció teljes elvesztéséhez vezetett, viszont a mozgás sebességét nem változtatta meg. Ezen adatok azt sugallják, hogy amikor a makrofágok apoptótikus timociták irányába vándorolnak elegendő adenzin keletkezik az A2BR-ok triggereléséhez is. Ennek az adenzin receptornak van a legkisebb az affinitása az adenzinhoz az adenzin receptorok közül. Ez alapján valószínűnek tűnik, hogy az A2BR-ok és az A3R-ok is meghatározó szerepet játszanak a kemotaktikus mozgás irányítottságának létrejöttében és fenntartásában. Ráadásul eredményeink arra engednek következtetni, hogy bár korábbi közlemények szerint (jóllehet complement C5 által fenntartott kemotaktikus mozgás kapcsán) az adenzin receptorok teljes hiányában az ATP és ADP receptorok is képesek irányított mozgást biztosítani (Kronlage és mtsai., 2010), akár csak az egyik adenzin receptor elvesztése is (vagy az A2BR, vagy az A3R) a kemotaktikus mozgás orientációjának zavarához vezet.

Exogén adenzin adása nem befolyásolja a vad típusú makrofágok apoptótikus sejtek irányába történő mozgását, de elősegíti az A3R hiányos makrofágokét

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy nagyobb adenzin koncentrációk képesek-e kompenzálni az A3R hiányából származó kemotaktikus migrációs zavart. Ehhez a vad típusú és az A3R hiányos makrofágok mozgását 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) jelenlétében is elemeztük. A NECA egy nem metabolizálható adenzin analóg, melyet 10 mM koncentrációban alkalmaztunk, hogy a legkisebb affinitású adenzin receptort is triggerelni tudjuk. Míg a NECA nem befolyásolta a vad típusú egerekből izolált makrofágok mozgását se apoptótikus sejtek jelenlétében se azok hiányában, addig az A3R hiányos makrofágok mozgásának kemotaxis indexét némiképp fokozta mikor azok elhaló sejtek jelenlétében mozogtak. Mindez arra utal, hogy az ATP és ADP jelátvitel zavartalansága esetén a magasabb adenzin koncentráció részben ellensúlyozhatja az A3R elvesztéséből származó mozgási defektust.

Az adenosin receptorokhoz kapcsolt jelátvitel önmagában képes az apoptotikus timociták irányába történő kemotaktikus mozgást biztosítani

Annak eldöntésére, hogy az adenosin receptorok önmagukban képesek-e (az ATP és ADP jelátvitel hiányában is) fenntartani a kemotaktikus migrációt, ahogyan azt korábban már felvetették (Kronlage és mtsai., 2010), további kísérleteket végeztünk. Ezekben vad típusú makrofágok mozgását vizsgáltuk apyráz és NECA jelenlétében, megszüntetve így az ATP és ADP jelátvitelt valamint az endogén adenosine képződést. A NECA-t 10 mM-s koncentrációban adva valamennyi adenosin receptort triggerelni tudjuk. Apyráz jelenlétében a NECA önmagában képes volt fenntartani a vad típusú makrofágok irányított kemotaktikus mozgását, megerősítve ezzel, hogy az intakt adenosin receptor jelátvitel önmagában képes biztosítani a kemotaktikus jelek kemotaktikus mozgássá alakítását. Mivel a NECA-t a tápfolyadékba keverve alkalmaztuk a kísérlet során, adataink arra engednek következtetni, hogy az irányított mozgás létrejöttéhez nincs szükség adenosin koncentráció gradiens jelenlétére. Mivel az apyráz lebonja az ATP-t, de NECA jelenlétében megindul a makrofágok irányított mozgása, adataink alátámasztják Elliot és mtsai. korábbi (Elliot és mtsai., 2009) következtetését is, miszerint az ATP nem egy obligát „find-me” szignál a makrofágok efferocitotikus mozgása során.

Az A2AR jelátvitel nem járul hozzá jelentősen a makrofágok kemotaktikus orientációjának szabályozásához az apoptotikus timociták irányába történő vándorlás során

Az egyes adenosin receptorok szerepének vizsgálta során az A2AR hiányos sejtek mozgását is vizsgáltunk apyráz jelenlétében. A purin nukleotidok és nukleozidok hiányában a sejtek velocitása alacsonyabb volt ($0.1 \pm 0.04 \mu\text{m}/\text{perc}$) és az orientációjuk is elveszett, ami nem különbözött az azonos körülmények között vizsgált vad típusú sejtek mozgásának jellemzőitől. Amikor az adenosin jelátvitelt visszaállítottuk NECA hozzáadásával, mind a kemotaxis index, mind a mozgás sebessége megemelkedett, bár az utóbbi nem érte el a vad típusú sejtek azonos körülmények között mért értékét.

Egyidejű A2BR és A3R jelátvitelre van szükség az adenosin-kapcsolt kemotaktikus navigáció zavartalanságához a makrofágok apoptotikus timociták felé vándorlása során

Az A2AR hiányos makrofágok mozgásának elemzése révén kapott eredmények arra utalnak, hogy A2AR hiányában az A3R és az A2BR együttesen képesek fenntartani az adenosin-kapcsolt kemotaktikus mozgást az elhalt timociták felé. Annak eldöntésére, hogy ezen két

receptor közül melyik felelős mindezt, az A2AR hiányos makrofágokat először A2BR antagonistá (MRS1754), majd A3R antagonistá (MRS3777) kezelésnek tettük ki. Azt találtuk, hogy egyik antagonistá jelenlétében sem volt képes a NECA helyreállítani a migrációs defektust. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az A2BR-ok és az A3R-ok is fontosak a NECA-kapcsolt kemotaktikus mozgás szabályozásában A2AR hiányában. Ez után A3R hiányos makrofágok mozgását elemeztük apyráz jelenlétében. Az apyráz a vad típusú és az A2AR hiányos makrofágok esetében látottakhoz hasonlóan lecsökkentette a mozgás sebességét és irányítottságát. A3R hiányában azonban a NECA, ellentétben A2AR hiányában tapasztaltakkal, nem tudta helyreállítani az apyráz kezelés által megzavart kemotaktikus mozgást, igazolva, hogy az A2 receptorok önmagukban nem elegendőek az adenzin hatásának közvetítéséhez. Ezen eredmények összességében arra engednek következtetni, hogy adenin nukleotidok hiányában az adenzin-kapcsolt jelátvitel önmagában képes zavartalan kemotaktikus mozgást biztosítani, ehhez azonban egyidejű A2R és A3R jelátvitelre van szükség. Ráadásul, meglepő módon, az A2R-ok közül az A2BR-oknak lehet nagyobb szerepe a kemotaktikus migráció szabályozásában.

Az A3R-ok elvesztése lelassítja a hasüregbe injektált apoptotikus timociták *in vivo* eltakarítását

Mivel azt találtuk, hogy az A3R hiányos makrofágok *in vitro* elvesztik orientációs képességüket az apoptotikus timociták irányába történő vándorlás során, megvizsgáltuk *in vivo* van-e jelentősége a receptor elvesztésének a hasüregbe injektált apoptotikus timociták eltakarítása során. E célból különböző számú CellTracker Deep Red Dye jelölt apoptotikus timocitát injektáltunk vad típusú és A3R hiányos egerek hasüregébe. Laboratóriumunkban folytatott korábbi kísérletek bizonyították, hogy az A3R elvesztése önmagában nem befolyásolja a makrofágok *in vitro* fagocitózis kapacitását (Duró és mtsai., 2014). A peritoneumban jelenlévő rezidens makrofágok képesek nagy számú elhalt sejt felvételére, bekebelezésére, de azt feltételeztük, hogy egy limitált apoptotikus sejtszámnál, amikor a hasüregi makrofágoknak meg kell találniuk “zsákmányuk”, a kemotaktikus navigációs képesség zavara hatással lehet az eltakarítás ütemére. Vad típusú és A3R $-/-$ egerek hasüregébe 2, 8 és 30 millió apoptotikus sejtet injektálva 30 percet követően kevesebb A3R $-/-$ makrofág vet fel legalább egy elhalt timocitát, mint ahány vad típusú. A legszembetűnőbb különbség akkor volt tapasztalható, amikor a legalacsonyabb (2×10^6) számban fecskendeztünk apoptotikus sejteket a peritoneumba. Ebben az esetben kétszer annyi vad típusú makrofág vett fel elhalt sejtet, mint ahány A3R $-/-$. Amikor a befecskendezett apoptotikus sejtek számát 30×10^6 -ra növeltük, a fagocitáló sejtek száma

mindkét esetben (vad típusú és A3R-/-) megemelkedett, de az alacsonyabb apoptótikus sejtszámnál látott kétszeres különbség a fagocitáló sejtek számában 10%-ra csökkent. Érdekes viszont, hogy bár nagy elhalt sejt számnál a fagocitáló makrofágok számában a különbség kisebb lett, az egyes A3R -/- makrofágok kevesebb sejtet tudtak ugyanannyi idő alatt bekebelezni mint a vad típusúak, amit jól tükröz a sejtek alacsonyabb fluoreszcencia intenzitása.

Az A3R-ok hiánya meglepő módon nem befolyásolja az apoptótikus timociták *in vivo* eltakarítását a timuszból dexamethasone kezelést követően

Egy másik *in vivo* kísérleti rendszerben azt vizsgáltuk, hogy vajon az A3R-ok hiánya befolyásolja-e a dexamethasone kezelést követően nagy számban elhaló timociták eltakarítását az egerek timuszból. Korábbi laboratóriumunkban készült tanulmányok bemutatták, hogy az A3R-ok elvesztése különböző mennyiségű elhalt sejt jelenlétében sem befolyásolja a makrofágok fagocitózis kapacitását (még ha szaturáló sejtszámot alkalmazunk sem, ami a Dex kezelést követően a timuszban is kialakul) (Duró és mtsai., 2014). Ahhoz, hogy biztosak legyünk, hogy az elhalt sejtek számában esetlegesen fennálló különbség a Dex kezelés után, az eltakarítás ütemével és nem a sejtek Dex érzékenységevel áll összefüggésben, először megvizsgáltuk, hogy az A3R elvesztése nem befolyásolja-e a timociták Dex kezelést követő elhalásának ütemét. *In vitro* dexamethasone kezelés majd Annexin V/propidium jodid festést követően azt találtuk, hogy nincs különbség vad típusú és A3R -/- timociták Dex érzékenységében. Így a továbbiakban azt követtük nyomon, hogy *in vivo* Dex kezelést követően meghatározott idő után, hogyan változik a vad típusú ill. A3R -/- egerek timuszában a sejtszám illetve az Annexin V pozitivitás. Meglepetésünkre ezen paraméterek megfigyelése során, az A3R hiányos makrofágok *in vitro* tapasztalt kemotaktikus orientációs zavara ellenére sem találtunk különbséget az elhalt timociták eltakarításának ütemében. További szövettani vizsgálatokat végeztünk a makrofágok *in vivo* timuszon belüli mozgásának elemzésére. Míg kezeletlen vad típusú egerek timuszában a makrofágok nagy része a timusz kortikális zónájában csoportosult, addig A3R hiányában a makrofágok nagy számban a timusz medulláris zónában helyezkedtek el. Már 1 órával a Dex kezelést követően láthatóak voltak a timusz kortikomedulláris zónájában a szervbe valószínűleg újonnan bevándorló makrofágok. 3 órával a kezelést követően, az A3R -/- makrofágok le voltak maradva a timusz kortikális, subcapsularis zónája felé vándorlásban a vad típusúakhoz képest. 6 órával a kezelés után azonban már semmilyen különbség nem volt észlelhető a két egértörzs timusza között. 12 óra elteltével mindkét egértörzs timuszában befejeződött a makrofágok vándorlása, amit a sejtek (maradék) kortikális zónába érkezése valamint a medulláris zónából való eltűnése jelzett.

4.2. Az apoptótikus sejteket bekebelező makrofágok nem-klasszikus retinoidokat termelnek fagocitózis kapacitásuk növelésére

A TG2 szintézisének emelkedése önmagában nem vezet a makrofágok fagocitózisának fokozódásához

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy az ATRA (Moore és mtsai., 1984) és az interferon γ (Bayardo és mtsai., 2012) is képes fokozni a TG2 kifejeződését a makrofágokban. Úgy döntöttünk megvizsgáljuk, hogy a TG2 szintézis fokozása révén növelhetjük-e a makrofágok apoptótikus sejt felvételét. Bár mindkét anyag fokozta a TG2 kifejeződést, az apoptótikus sejtek felvételének szignifikáns fokozódása csak ATRA kezelés hatására következett be. Hasonló fagocitózis fokozódást figyeltünk meg azonban TG2 hiányos makrofágokban is ATRA kezelés hatására, ami azt mutatta, hogy az ATRA a TG2 mellett más fagocitózis kapcsolt gének kifejeződését is befolyásolja. Különböző retinoidokkal végzett 24 órás kezelést követően, qPCR analízist végeztünk és azt találtuk, hogy a TG2 mellett 6 másik fagocitózis kapcsolt gén expressziója is jelentősen megemelkedik a retinoidok hatására. Ezek a Mertk, Stabilin-2, Tim4, ABCA1, CD14 és C1q voltak. A szintén fagocitózis kapcsolt integrin $\beta 1$, MFG-E8, thrombospondin, CD91 vagy CD36 kifejeződése nem változott, míg a scavenger receptor A, integrin $\alpha_v\beta_3$, és β_5 szintje csökkent.

A természetes pan RAR agonista ATRA-n kívül (ami a sejtekben 9cRA-vá alakulhat (Heyman és mtsai., 1992)), az összes tesztelt retinoid: 9cRA (pan RAR és RXR agonista), Am580 (szintetikus pan RAR agonista), LG268 (szintetikus RXR agonista) a TG2 szint emelkedését és a fagocitózis fokozódását váltotta ki. A leghatékonyabbnak viszont az ATRA és a 9cRA bizonyult, jelezve, hogy az RXR és az RAR receptorok is hozzájárulhatnak a TG2 indukció és a fagocitózis fokozásához, a hatás pedig akkor a legkifejezettebb, amikor mindkét receptor stimulációja bekövetkezik. Az ATRA szenzitív fagocitózis kapcsolt gének kifejeződését az ATRA-hoz hasonlóan változtatta meg a 9cRA és az LG268 (bár az LG268 kevésbé volt hatékony). Az Am580 kezelés nem eredményezett változást a Mertk és az ABCA1 kifejeződésben, mutatva, hogy ezen gének nem állnak RAR/RXR szabályozás alatt. Mindezek arra utalnak, hogy a retinoidok facilitálhatják a fagocitózist a makrofágokban az RAR/RXR és más RXR heterodimerek triggerelése révén is. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy akárcsak a TG2 elvesztése esetén, a CD14 izolált hiánya sem eredményez önmagában jelentős változást a ATRA kezelés fagocitózisra kifejtett hatásban. Valószínűleg CD14 hiányában is több ATRA érzékeny gén kifejeződésének megváltozása vezet a fagocitózis fokozódásához.

Az LXR aktiválása retinoid termelést vált ki a hasüregi makrofágokban

Laboratóriumunkban folytatott korábbi kísérletek bizonyították, hogy a timuszban kiváltott *in vivo* apoptotikus sejtelhalás a timuszban termelődő retinoidok mennyiségének fokozódásával jár együtt, valamint, hogy a retinoidok termelésért felelős sejtek, melyek a retinaldehid dehidrogenáz (RALDH) enzimeket expresszálják, az elhaló timocitákat bekebelező makrofágok (Garabuczi és mtsai., 2013). Az apoptotikus sejtek *in vitro* felvétele szintén fokozza a makrofágokban a RALDH enzimek kifejeződését, igazolva, hogy az apoptotikus sejtfelvétel retinoid szintézishez kapcsolt folyamat. A makrofágokban legtöbbször három lipid érzékelő magreceptor (LXR, PPAR γ és PPAR δ) van összefüggésbe hozva az apoptotikus sejtfelvételt kísérő génkifejeződés változás szabályozásával (A-Gonzalez és mtsai., 2009; Roszer és mtsai., 2011; Mukundan és mtsai., 2009), ezért úgy döntöttünk megvizsgáljuk, vajon ezen receptorok aktiválása hatással van-e a RALDH enzimek kifejeződésére. Azt találtuk (Garabuczi és mtsai., 2013), hogy mind a három fenti receptor agonistákkal való aktiválása a RALDH1 mRNS szintjének fokozódásához vezet. A legnagyobb RALDH kifejeződésre kifejtett hatása az LXR agonista GW3965-nek volt (Garabuczi és mtsai., 2013), ezért úgy döntöttünk *in vivo* méréseket is végzünk a RARE lacZ egerek (Rossant és mtsai., 1991) segítségével, hogy az LXR triggerelése *in vivo* is fokozott retinoid termelést vált-e ki. E célból 20 mg/kg GW3965-tel intraperitoneálisan oltottunk RARE lacZ egereket, majd 24 órával később a RALDH1 és a β -galactosidase mRNS szinteket vizsgáltuk a hasüregből izolált makrofágokban. A lacZ kifejeződés az *in vivo* retinoid függő transzkripció aktivitására utal. A kezelés a RALDH1 és a lacZ kifejeződését is indukálta, mutatva, hogy az LXR aktiváció fokozott RALDH kifejeződéshez és következményes retinoid termeléshez vezet *in vivo*. Amellett, hogy kimutattuk a β -galactosidáz kifejeződést a fehérje enzimatis aktivitása révén (makrofágok kék festődése), azt találtuk, hogy a TG2 kifejeződés is fokozódott. Bár a RALDH inhibitor DEAB-t nem tudtuk *in vivo* optimális koncentrációban alkalmazni, mivel az magasabb dózisok mellett az egerekre lethális hatást fejtett ki, a még tolerálható legmagasabb dózis mellett a lacZ és TG2 szint emelkedés mérséklődését figyeltük meg, ami megerősíti, hogy ezen gének kifejeződésének növekedése az *in vivo* retinsav szintézissel áll összefüggésben.

A makrofágok apoptotikus sejtfelvétele során az LXR aktiváció fagocitózis növelő hatása retinoid függő

Mivel korábbi tanulmányok is arra az eredményre jutottak, hogy az LXR aktiváció az apoptotikus sejtek felvételének fokozódásához vezet (A-Gonzalez és mtsai., 2009), azt kezdtük vizsgálni vajon az LXR indukciót követő retinoid szintézis hozzájárul-e a fagocitózis

fokozódásához a makrofágokban. A GW3965-vel történő 2 órán keresztül folytatott kezelés nem változtatta meg a makrofágok *in vitro* fagocitáló képességét. 24 órás kezelést követően azonban a fagocitózis kapacitás jelentős növekedését tapasztaltuk, ami a DEAB LXR agonistával történő egyidejű adása esetén teljesen elmaradt. Bár 2 órás LXR stimulációt követően még nem láttunk változást a makrofágok fagocitózis kapacitásában, két fagocitózis kapcsolt gén, a Mertk és az ABCA1, valamint az LXR α kifejeződése már ennyi idő alatt fokozódott. A Mertk és az ABCA1 volt az a két fagocitózis kapcsolt gén, melyek kifejeződését az általunk tesztelt retinoidok közül a pan RAR agonista Am580 nem befolyásolta, illetve amelyek az LXR α -val együtt közvetlen LXR célgénként vannak számontartva (A-Gonzalez és mtsai., 2009; Rébé és mtsai., 2009; Costet és mtsai., 2000). A RALDH gének, melyek kifejeződése szintén fokozódott a kezelés hatására, nem tartoznak az LXR által közvetlenül szabályozott gének közé, azonban ismert SREBP-1c célgénnek (Huq és mtsai., 2006), mely transzkripciós faktor saját génje promóterében két LXR válaszadó elemet is tartalmaz (Yoshikawa és mtsai., 2001). Az SREBP-1c expressziójára irányuló méréseink során azt találtuk, hogy az LXR stimulációt követő 2 óra múlva ezen gén kifejeződése is fokozódott. Azon gének kifejeződése azonban, melyek indukciója a korábbi kísérletekben a pan RAR agonista AM580 hatására is bekövetkezett (TG2, C1q, stabilin-2, Tim4, and CD14), 2 órával az LXR stimulációt követően még változatlan volt. Ezen felül, az LXR agonistával egy időben adott aldehyd dehidrogenáz inhibitor DEAB-nak semmilyen hatása nem volt az LXR stimuláció hatására indukálódó gének expressziójának fokozódására. Ugyanezen gének kifejeződésének 24 óra LXR stimulációt követő vizsgálata azt mutatta, hogy azon fagocitózis kapcsolt gének expressziója fokozódott, melyek kifejeződése korábban az ATRA vagy 9cRA kezelés hatására is megemelkedett. A korábbi kísérletekben Am580 hatására is fokozott expressziót mutató gének (TG2, C1q, stabilin-2, Tim4, and CD14) DEAB egyidejű adása esetén egyáltalán nem indukálódtak. Ráadásul ezen 5 gén LXR általi indukciója egy pan RAR antagonist (AGN193109) egyidejű adásával szintén gátolható volt. Összegezve ezen kísérletek eredményeit, megállapíthatjuk, hogy a TG2, a C1q, a stabilin-2, a Tim4, és a CD14 öt olyan fagocitózis kapcsolt molekula, melyek indukciója része az LXR útvonalnak, de valójában RAR szabályozás alatt állnak, expressziójuk növekedése egy újonnan szintetizálódott retinoid megjelenéséhez kötött. Annak vizsgálatára, hogy a retinoid receptorok expresszióját befolyásolja-e az LXR stimuláció, több receptor kifejeződését is megvizsgáltuk GW3965 kezelést követően. Egyedül az RAR α kifejeződésének növekedése következett be, ami összhangban áll egy korábbi közleménnyel, mely szerint az RAR α közvetlen LXR célgén (Rébé és mtsai., 2009).

Az LXR stimuláció különböző fagocitózis kapcsolt receptorok kifejeződését indukálja a stimuláció időtartamának függvényében

A továbbiakban az egyes fagocita receptorok illetve a retinoid szintézisért felelős molekulák indukciójának időbeli változását vizsgáltuk. Az SREBP-c1 és a Mertk expressziója az LXR stimulációt követően rövid időn belül megemelkedett, összhangban azzal, hogy ezek ismert LXR célgének (A-Gonzalez és mtsai., 2009, Yoshikawa és mtsai., 2001; Costet és mtsai., 2000). A RALDH-k expressziójának fokozódása időben a közvetlen LXR célgének indukcióját követte, majd a RAR-függő fagocitózis-kapcsolt gének, a TG2, C1q, és a Tim4 következtek. A 24 órás egyidejű DEAB kezelés a RAR-függően szabályozott gének kifejeződése mellett az LXR célgének indukcióját is befolyásolta, ami az újonnan szintetizált retinoid LXR szabályozás alatt álló génekre kifejtett hatására enged következtetni. Ebben az LXR/RXR heterodimerek RXR oldaláról történő ligálása lehet egy lehetséges mechanizmus, ami mint egy autoregulációs pozitív feed-back szabályozó kar működhet az LXR jelátviteli útvonalon.

Annak bizonyítására, hogy a GW3965 kezelést követően megfigyelt változások valóban LXR stimuláció következményei-e, megvizsgáltuk több gén kifejeződését az LXR α / β elcsendesítését követően is. Az LXR elcsendesítése hatékonyan csökkentette LXR α és LXR β fehérjék szintjét valamint megakadályozta az SREBP-1c, Mertk, Tim4, és TG2 kifejeződésének GW3965 általi indukcióját. Ráadásul az LXR elcsendesítése meggátolta a GW3965 fagocitózis fokozó hatásának kifejeződését is, mutatva, hogy a GW3965 valóban az LXR receptorokon keresztül hat a makrofágokra.

Az apoptotikus sejteket bekebelező makrofágok nem-klasszikus retinoidokat termelnek

Céljaink között szerepelt a makrofágok által termelt RAR aktiváló molekula azonosítása is. Mivel jelenleg technikailag nem kivitelezhető, hogy elegendő makrofágot izoláljunk a tímusból a retinoid produkciójuk vizsgálatához, úgy döntöttünk, hogy teljes tímusz szövetet analizálunk. Korábban már kimutattuk, hogy *in vivo* apoptózis indukciót követően a tímuszban a RALDH kifejeződés fokozódik valamint a LacZ is detektálhatóvá válik a RARE LacZ egerek tímuszában (Garabuczi és mtsai., 2013). A LacZ kifejeződés a RARE LacZ egerekben egy endogén RAR aktiváló ligand keletkezésére utal. Ráadásul mivel a Dex kezelést követő LacZ indukció DEAB-bal gátolható volt, eredményeink arra utaltak, hogy ezek a bioaktív anyagok RALDH függően szintetizálódnak *in vivo*. 0,3 mg/egér intraperitoneálisan injektált Dex nagy számú timocita apoptózisához vezet, ami 24 óra alatt a tímusz tömegének 60%-os csökkenését eredményezi, részben az elhalt sejtek hatékony fagocitózisa következtében (Szondy és mtsai.,

1997). Ezzel párhuzamosan a Dex kezelés jelentősen növeli a timuszban az LXR, RALDH, TG2, Tim4, CD14, C1q, és Mertk kifejeződését.

A retinoid produkció analíziséhez 4 hetes egereket kezeltünk 24 órán át Dex-nal. A kezelés előtt és után mértük a timuszokban a retinoidok mennyiségét. Korábbi közleményünkkel (Kiss és mtsai., 2008) összhangban sem a retinsav cisz izomerjei (9cRA, 13cRA) sem az ATRA nem volt jelen a mintákban vagy/illetve az LC MS/MS technikánkkal detektálható legkisebb mennyiség ($\sim 10^{-9}$ M) alatti volt mennyiségük. Semmilyen jelét nem tapasztaltunk, hogy a Dex kezelés hatására megváltozott volna mennyiségük. Ezért további Dex kezeléssel összefüggésben megjelenő csúcsokat (molekulákat) kerestünk a tömegspektrometriai elemzés során, melyek közül egyetlen volt, ami DEAB egyidejű adásakor nem jelent meg. Ez egy 302 Da molekulatömegű molekula lehet, melynek egér timuszban való megjelenését a Dex kezelés váltja ki. Az MS készülék beállítása alapján egy dihidro-retinsav származékról lehet szó. A dehidrogenáció pontos helye a molekulán a retinsav molekulán jelenlévő nagyszámú kettős kötés valamint a hiányzó standard molekula miatt egyelőre nem mondható meg pontosan.

Korábbi tanulmányok bizonyították, hogy számos szövetben létezik egy alternatív retinoid metabolizációs útvonal, melyen a retinol először dihidro-retinollá alakul a retinol-szaturáz enzim közreműködésével (Moise és mtsai., 2004). A dihidro-retinolt a RALDH enzimek továbbalakítják dihidro-retinsavakká (Moise és mtsai., 2005), melyek alacsony affinitású RAR ligandokként játszhatnak szerepet a RAR jelátviteli utvonal szabályozásában (Moise és mtsai., 2009). Dex kezelés által kiváltott *in vivo* apoptózis indukciót követően a timuszban fokozódik a retinol szaturáz kifejeződése, ami kapcsolatban állhat az általunk keresett retinoid produkciójával.

5. MEGBESZÉLÉS

A szöveti homeosztázis fenntartásában a programozott sejthalálnak a legtöbb szövetben fontos szerepe van. Ha az elhalt sejtek eltakarítása zavarttá válik, az elhalt sejtek szétesnek, ami sejtalkotóik kiáramlásához, a környező szövetek károsodásához és gyulladásához vezet. Jelenlegi tudásunk szerint a gyulladás egy olyan védelmi reakció, mely a különféle patogénekre, sérült sejtek által keltett stimulusokra adott nem-specifikus immunválasz részjelensége. Célja a káros, veszélyes stimulus forrásának demarkálása, eltávolítása, valamint a gyógyulási, reparációs folyamatok elindítása (Ferrero-Miliani és mtsai., 2007). Széles körben elfogadott nézet, hogy az apoptotikus sejtek eltávolításának zavara gyulladásban jellemző folyamatokat indukál és hozzájárul több- jellemzően krónikus gyulladással járó- betegség kialakulásához és progressziójához. Az elmúlt évtizedben az elhalt sejtek eltakarításának (efferocytosis) molekuláris szabályozásával kapcsolatos ismereteink jelentősen kibővültek. Ezek megértése és további kutatása révén olyan új molekuláris mechanizmusokat ismerhetünk meg, melyek farmakológiai eszközökkel való befolyásolása elősegítheti a hatékony sejtfevételt, ami így az efferocitózis zavarával kapcsolatban álló betegségek jövőbeli terápiájában fontos lehet.

Ilyen betegség a parodontium krónikus gyulladásával járó parodontitis. Pathogenetikáját illetően klasszikus multifaktoriális kórállapot, mely a patogén baktériumok hiányában nagy valószínűség szerint nem alakulna ki. A baktériumok azonban a legalaposabb szájhigiénés eljárásokkal sem eliminálhatóak teljesen a szájból, ahol szervezetünk legváltozatosabb mikrobiális flórája található. A parodontitis alapvetően egy krónikus fertőzésnek tekinthető, melynek progresszióját egyre több kutatás szerint az apoptotikus sejtelhalás zavara, valamint az elhalt sejtek nem kellően hatékony eltakarítása is jelentősen befolyásolja. Az apoptózis és efferocitózis szabályozása szövet és sejtspecifikus, ráadásul az efferocitózis kapcsolt kemotaktikus szignálok sejttípus függő jelátviteli útvonalakat aktiválnak, ami egy igen összetett pathofiziológiai szabályozásra illetve zavarra engednek következtetni egy hisztológiailag olyan komplex szövetben, mint a fogágy (Joós G., 2014).

Az efferocitózis folyamata négy lépésre bontható. A fagociták (elsősorban a makrofágok) apoptotikus sejtek irányába történő kemotaktikus vándorlásával indul, amit az elhalt sejtek

számos változatos sejtfelszíni receptor és adapter molekula részvételével történő bekebelezése követ.

Egyre több kísérleti bizonyíték támasztja alá, hogy a hatékony kemotaktikus vándorláshoz a fagociták oldalán a purinerg jelátvitel aktivációjára is szükség van (Chen és mtsai., 2006; Kronlage és mtsai., 2010), valamint, hogy a bekebelezés során biológiailag aktív A vitamin származékok, retinoidok keletkeznek (Garabuczi és mtsai., 2013). A disszertációm alapját képző tanulmányokban egyrészt megvizsgáltuk az egyes adenosin receptorok- különös hangsúllyal az A3R- szerepét a makrofágok efferocitózis-kapcsolt kemotaktikus mozgásának szabályozásában, másrészt elemeztük, hogy az LXR magreceptor stimulációja és az ezt követő retinoid szintézis, hogyan hat a fagocitózisa.

Bár az ATP-t és annak bomlástermékeit korábban, mint potenciális „find me” szignálok tartották számon az efferocitózis kezdeti szakaszában, később neutrofilek vándorlásának vizsgálata során kiderült, hogy más funkciójuk lehet (Chen et al., 2006). Az új modell szerint a purinerg jelátvitelnek a kemotaktikus jeleket felerősítő illetve azokat irányított mozgássá alakító szerepe van. A purinerg jeleket érzékelő receptorok (döntően P2Y2 illetve A3R-ok) a vándorló sejtek mozgás irányába mutató elülső felszínén csoportosulva aktivációjukat követően egy feedback jelátviteli folyamatot indítanak, melynek kulcsszerepe van a hatékony, irányított mozgás létrejöttében (Chen et al., 2006). Egy ezt követő tanulmány szerzői hasonló szabályozási mechanizmust tártak fel a makrofágok kemotaktikus mozgásának hátterében. Azt is megfigyelték, hogy a sejtek lamellopodiumain kemotaktikus szignál jelenlétében az ATP, ADP vagy az adenosin jelátvitelhez kötődően kiboltosulások jelennek meg (Kronlage et al., 2010). A makrofágok kemotaktikus mozgása során a különböző adenosin receptorok pontos szerepét a mi *in vitro* és *in vivo* kísérleteinket megelőzően azonban még nem vizsgálták. Eredményeink megerősítik, hogy az adenosin receptoroknak jelentős szerepe van a mozgás szabályozásában. Az egyes adenosin receptorok elvesztése eltérően befolyásolja a mozgást: Intakt ATP és ADP jelátviteli útvonalak jelenlétében az A3R és az A2BR hiánya is zavarttá teszi a kemotaktikus orientációs képességet, míg a mozgás sebessége csak kis mértékben változik. Megerősítettük Kronlage és mtsai. következtetéseit, miszerint az adenosin receptorok aktivációja önmagában képes a makrofágok kemotaktikus mozgásának irányítottságát fenntartani: apyraz adásakor (ami az ATP, ADP és adenosin hiányához vezet) a szintetikus adenosin analóg NECA együttes adása képes fenntartani a zavartalan kemotaktikus mozgást. Érdekes módon ez azonban csak akkor figyelhető meg amikor egyidejű A2R és A3R aktiváció

is bekövetkezik. Ráadásul a mozgás zavartalan fenntartásában az A2R-ok közül, az adenozt kisebb affinitással megkötni képes A2BR tűnik meghatározóbbnak.

Bár mindkét A2 receptor aktivációja az intracelluláris cAMP szintet emeli, eredményeink a makrofágok mozgásának adenzin receptorokon keresztüli cAMP független szabályozására engednek következtetni. A jelátviteli mechanizmus vizsgálata ugyan nem volt célunk kísérleteinkben, nem zárható ki, hogy a cAMP a mozgás sebességének szabályozásában játszhat szerepet, például az Epac-Rap1 útvonalon keresztül, mint, ahogy ez a dendritikus sejtek vonatkozásában már felmerült (Ring és mtsai., 2015). A makrofágok kemotaktikus vándorlásának hátterében működő jelátviteli útvonalakat több tanulmány vizsgálta, melyek tanulsága szerint a mozgás irányításában vagy a p38 α MAP kináz vagy PI3 kináz szabályozta útvonalak vehetnek részt (Cuenda és mtsai., 2007, Jones, 2000). Az apoptotikus sejtekből származó „find-me” szignálok közül a lizofoszfatidil-kolin és a szfingozin-1-foszfát PI3 kináz-függő migrációt vált ki (Yang és mtsai., 2005, Rosen és mtsai., 2009), míg a fractalkine syk-függő (Gevrey és mtsai., 2005) PI3 kináz és MAP kináz aktivációhoz vezet (Kansra és mtsai., 2001). Ebben az összefüggésben érdemes megjegyezni, hogy míg az A2AR-ok nem befolyásolják a fenti útvonalakat, az A3R-ok bizonyítottan aktiválják a PI3 kináz és p38 α MAP kináz pályákat (Hammarberg és mtsai., 2004), míg az A2BR-ok aktivációja minden MAP kináz útvonalat érint (Aherne és mtsai., 2011). Azt azonban nem tudjuk pontosan megmondani, hogy a makrofágok apoptotikus timociták irányába történő mozgását melyik „find-me” szignál vagy szignálok válthatják elsősorban ki: egyes szerzők szerint a fentiek közül egyik sem vesz benne részt (Elliot és mtsai., 2009). Az ATP szerepét lehetséges „find-me” szignálként (Elliot és mtsai., 2009) sem a Kronlage csoport eredményei (Kronlage és mtsai., 2010), sem a mi eredményeink nem támasztják alá. Érdekes módon a mi kísérleteinkben, ahol apoptotikus timocitákból kijutó szignálok hatására mozogtak a makrofágok, az apyráz jelentősen befolyásolta a mozgás sebességét, míg egyáltalán nem befolyásolta azt, amikor a makrofágok egy C5a gradiens mentén vándoroltak (Kronlage és mtsai., 2010). Technikai okok miatt sajnos, ezen korábbi kísérleteket mi nem tudtuk reprodukálni. Amennyiben ez a különbség valóban fennáll, az azt jelentené, hogy a purinerg jelátvitel kemotaktikus szignál specifikus, tehát a kemotaktikus jel függvényében járulhat hozzá a kemotaktikus mozgás szabályozásához, a különböző jelátviteli útvonalak aktivációja révén,

Az adenzin potenciális szerepét, mint apoptotikus timocitákból származó „find-me” szignál egy korábbi tanulmány már vizsgálta (Elliot és mtsai., 2009). Ezen kísérletek tanulsága összhangban áll a mi eredményeinkkel, miszerint az adenzin hozzájárul a kemotaktikus mozgás szabályozásához, de ehhez nincs szükség adenzin koncentráció gradiens

kialakulására, tehát az adenzin önmaga nem kemoattraktáns természetű anyag a makrofágok efferocitotikus mozgása során. Ráadásul bár az apoptotikus timociták környezetében végbemegy az ATP AMP-vé alakulása (Yamaguchi és mtsai., 2014), adenzin az 5'nucleotidase hiánya miatt nem képződik (Köröskényi és mtsai., 2011). Munkacsoportunk közelmúltban folytatott kutatásai világítottak rá, hogy a timuszban az adenzin a makrofágok felszínén expresszáldó 5'nukleotidáz közreműködésével keletkezik (Sándor és mtsai., 2016). Ez arra utal, hogy az endogén adenzin közvetlenül a makrofágok felszínén jön létre, ahol autokrin és parakrin úton aktiválja a sejtfelszíni adenzin receptorokat (Köröskényi és mtsai., 2011).

Egy tumorbiológiával foglalkozó tavalyi tanulmány is fontos bizonyítékokat szolgáltat arra vonatkozóan, hogy az adenzin fontos a makrofágok migrációjának szabályozásában. E szerint a rosszindulatú daganatok adenzin termelés révén érik el a myeloid sejtek tumorinfiltrációját (Montalbán Del Barrio és mtsai., 2016, Koszalka és mtsai., 2015). Adenzin mentes tumorkörnyezetben és az ADP receptor stimuláló α,β -methylenadenosine 5'-diphosphate jelenlétében, az egyes adenzin receptorok stimulációja a myeloid sejtek migrációjának élénküléséhez vezet (ebben az A3R volt a leghatékonyabb, az A2BR-t nem vizsgálták) (Koszalka és mtsai., 2016). A mi kísérleteinkben az adenzin analóg NECA az A3R hiányában normalizálta a makrofágok vándorlását, míg a vad típusúakét nem befolyásolta.

Tanulmányunkban a kemotaktikus navigáció zavarának *in vivo* konzekvenciáit is törekedtünk vizsgálni. Bár az A3R elvesztése *in vitro* nem vezet az elhaló sejtek felvételének zavarához (Duró és mtsai., 2014), *in vivo* azt tapasztaltuk, hogy A3R hiányában a hasüregbe fecskendezett apoptotikus sejtek eltakarítása zavarttá válik. Mindez arra utal, hogy a kemotaktikus tájékozódási képesség zavara *in vivo*, az elhalt sejtek eltávolításának ütemét csökkenti, még ha a fagocitózis zavartalan is. Meglepetésünkre hasonló eltérést nem találtunk Dex kezelést követően a timuszban. Ennek egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a timuszban rezidens makrofágok kemotaktikus vándorlásában az A3R-ok nem játszanak meghatározó szerepet. A timuszban a Dex érzékeny CD4+/CD8+ timociták érésük, differenciálódásuk során már azelőtt clustereket formálnak a kortikális makrofágokkal, mielőtt a Dex kezelés hatására elhalnak (Rezzani és mtsai., 2008). Így az elsőként elhaló timociták felvétele, eltakarítása elképzelhető, hogy nem is igényel kemotaktikus vándorlást a makrofágok részéről, nem beszélve arról, hogy a Dex kezelés még növeli is a makrofágok fagocitózis kapacitását (McColl és mtsai., 2009, Garabuczi és mtsai., 2015). A makrofágok zavart migrációját korábban azonban már összefüggésbe hozták az elhalt timociták timusból történő eltakarításának lelassulásával *in vivo* (Elliot et al., 2009). Egy másik csoport megfigyeléseivel (Odaka és mtsai., 2002)

összhangban, mi is azt figyeltük meg, hogy glükokortikoid kezelés hatására az apoptótikus timocitákból kiáramló kemoattraktánsok további F4/80⁺ makrofágokat vonzanak a timusz kortikális zónájába. Jóllehet a makrofágok timuszba vándorlását illetve a monocita-endothel sejt interakció létrejöttét az apoptótikus sejtekről lefűződő biológiailag aktív oxidált foszfolipideket tartalmazó membránvezikulumokkal hozták korábban összefüggésbe (Huber és mtsai., 2002). A makrofágok timuszba vándorlását már 1 órával a Dex kezelést követően mi is észleltük. Azonban, még a vad típusú egerekben a makrofágok azonnal elkezdtek a timusz kérgi területe irányába mozogni, addig az A3R hiányos makrofágok kezdetben a medulla zónájában csoportosultak nagy számban. A mozgáskoordináció zavara ellenére viszont később jelentős számú A3R hiányos makrofág is képes volt eljutni a kortexbe. Ráadásul a timusz kéreg állományában Dex kezelés után a makrofágok korlátlan számban érintkeznek apoptótikus timocitákkal (Szondy és mtsai., 1997), így valószínűleg a kemotaktikus navigáció zavara ellenére is nagyszámú elhalt sejtet tudnak bekebelezni. A timusz kortexben, az elhaló sejtekből igen nagy mennyiségben ATP is felszabadul (Resta és mtsai., 1997) aminek a bomlástermékei némiképp javíthatják a kemotaktikus mozgás zavarát, még az A3R-ok hiányában is. Az A3R-ok jelentősége az *in vivo* apoptótikus sejteltakarítás folyamatának későbbi időpontjaiban valószínűleg még kisebb lehet, hiszen ahogy azt egy korábbi tanulmányunk mutatta, amint a makrofágok elkezdenek apoptótikus sejteket felvenni, elkezd csökkenni az A3R-ok sejtfelszíni expressziója (Duró és mtsai., 2014). Érdekes módon apyráz kezelést követően *in vivo* csökken a apoptótikus sejtek eltakarításának az üteme a timuszban, ami arra utal, hogy a zavart sejtmigráció mégiscsak hatással lehet a timuszban zajló efferocitózisra (Elliot és mtsai., 2009). *In vitro* adataink alapján azonban úgy tűnik, az apyráz nem csak a kemotaktikus navigációt, de a mozgás sebességét is megváltoztatja. Az apyráz kezelés közvetlenül a fagocitózisra gyakorolt esetleges hatását még nem vizsgáltuk.

Összegezve eredményeink, azt gondoljuk, hogy az adenzin receptorok meghatározó szerepet játszanak a makrofágok apoptótikus timociták irányába történő kemotaktikus vándorlásának irányításában. Az A3R elvesztése azonban az *in vitro* és *in vivo* bizonyítékok ellenére nem eredményez fenotípus változást a timuszban, amit magyarázhat, hogy a timuszban rezidens makrofágok nem biztos, hogy A3R-okat használnak mozgásuk orientációjának szabályozásához, illetve elképzelhető, hogy a kemotaktikus navigáció zavara önmagában nem meghatározó jelentőségű a timuszban zajló apoptótikus sejt clearance során.

A disszertáció második felében, az elhalt sejtek bekebelezésének hátterében zajló jelátviteli folyamatokkal kapcsolatos vizsgálataink mutatom be. Bár a legtöbb partikulum fagocitózisa egy bizonyos makrofág receptor működéséhez kötött, az apoptotikus sejtek felvételéhez több különböző receptor és adapter molekula együttes részvételére van szükség (Stuart és mtsai., 2005, Ravichandran és mtsai., 2007). Korábbi laboratóriumunkban zajló kutatások kimutatták, hogy a TG2 az MFG-E8 és az integrin $\beta 3$ koreceptoraként (Tóth és mtsai., 2009) a sejtfelszíni fagocitózis-kapcsolt fehérjék csoportjába tartozik, hiánya esetén az elhalt sejtek *in vivo* eltakarítása zavarttá válik és SLE-szerű autoimmunitás alakul ki (Szondy és mtsai., 2003). Hasonlóképp, más fagocitózis-kapcsolt receptorok egyedi hiánya, szintén csökkenti a makrofágok fagocitózis kapacitását (Hanayama és mtsai., 2002, Savill és mtsai., 1992, Botto és mtsai., 1998, Devitt és mtsai., 2004, Park és mtsai., 2009, Greenberg és mtsai., 2006, Albert és mtsai., 2000, Cohen és mtsai., 2002, Park és mtsai., 2008, Hamon és mtsai., 2006).

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a makrofágokban az elhalt sejtek lipidtartalmát az RXR heterodimerek családjába tartozó lipid érzékelő magreceptorok (LXR, PPAR-ok) érzékelik, melyek aktivációjukat követően számos fagocitózis kapcsolt gén kifejeződését megváltoztatják. A fagocitózis kapacitás ezen receptorok aktivációja révén fokozható olyan esetekben, mikor *in vivo* nagy számú elhalt sejt eltakarítására van szükség (A-Gonzalez et al., 2009, Roszer et al., 2011, Mukundan et al., 2009). Az LXR vagy PPAR δ receptorok hiánya az apoptotikus sejtek felvételének zavarán túl, szintén SLE-szerű autoimmunitás kialakulásához vezet (A-Gonzalez et al., 2009, Mukundan et al., 2009).

Az LXR/RXR heterodimer receptorok ligációja endogén retinoid szintézist is indukál (Aydemir et al., 2013). Ezzel a megfigyeléssel párhuzamosan egyik kollégám is azt találta, hogy az apoptotikus sejtek felvételét követően az endogén retinoidszintézisért felelős gének is indukálódnak (Garabuczi et al., 2013). A munkacsoportunk közölte, hogy az efferocitózis kapcsolt retinoid produkció hozzájárulhat az apoptotikus timocitákban a TG2 kifejeződés fokozódáshoz (Garabuczi et al., 2013), illetve a timuszban zajló szelekciós folyamatok modulációjához (Sarang et al., 2013). Egy másik csoport azt is leírta, hogy a légutakban a makrofágok által termelt retinoidok hozzájárulnak a T_{reg} sejtek differenciálódásához (Soroosh et al., 2013).

Vizsgálataink során megerősítettük, hogy az LXR aktiváció fokozza a Mertk és az ABCA1 expresszióját (A-Gonzalez et al., 2009), melyek LXR szabályozás alatt álló fagocitózis kapcsolt gének, valamint, hogy az LXR stimuláció az endogén retinoid szintézisért felelős gének indukcióján keresztül retinoid termelést vált ki (Aydemir et al., 2013; Garabuczi et al., 2013).

Az így keletkező retinoid a RAR aktiváción keresztül további fagocitózis kapcsolt gének kifejeződését növelte, (pl.: TG2), de hozzájárult az LXR, Mertk és ABCA1 expressziójának hosszabb távú fokozásához is, nagy valószínűséggel az LXR heterodimer RXR oldalához való kötődés révén.

Azt találtuk, hogy a TG2 kifejeződés fokozása önmagában nem elegendő a makrofágok fagocitózis kapacitásának növeléséhez. Ez összhangban áll azon korábbi megfigyelésünkkel, miszerint a rekombináns TG2 jelentősen fokozza a TG2 hiányos makrofágok fagocitózis kapacitását, de nem befolyásolja a vad típusúakét (Tóth et al., 2009). Az exogén retinoid kezelés hatékonyan növelte a fagocitózist, ráadásul azon makrofágokban is, melyekben egy fagocitózis kapcsolt molekula izolált hiánya állt fenn (TG2 vagy CD14). Az egyik tesztelt retinoid az ATRA volt, mely számos fagocita receptor és hídképző molekula expresszióját növelte, utalva rá, hogy a fagocitózis kapacitás emelkedés hátterében számos gén indukciója szerepet játszik. A különböző retinoid receptor agonisták hatásának elemzése azt mutatta, hogy a gének egy csoportja RAR ligációt követően mutatott fokozott expressziót (TG2, Stabilin-2, Tim4, CD14 és C1q) míg mások (Mertk és ABCA1) az RXR heterodimerek ligációját követően. Ennek megfelelően azon retinoidok fokozták a legnagyobb mértékben az apoptotikus sejtek felvételét, melyek képesek voltak az RAR és RXR transzaktivációjára.

Megvizsgáltuk, hogy az LXR indukált fagocitózis fokozódásban szerepet játszik-e a retinoid szintézis. A retinoid termelés gátlása a RALDH enzimek gátlásán keresztül megakadályozta a fagocitózis fokozódást LXR aktivációt követően, ami a retinoidok részvételére utal az LXR hatásának kialakulásában. Tudomásunk szerint ez az első kísérletes bizonyíték az endogén retinoid szintézis fagocitózis kapacitás szabályozásban betöltött szerepére vonatkozóan.

Szerettük volna a makrofágok által termelt retinoidokat is pontosan meghatározni. Munkacsoportunk korábbi publikációjával (Kiss és mtsai., 2008) összhangban azonban, egy klasszikus retinsav sem volt kimutatható a timuszban. Találtunk viszont egy „apopto-fagocitózis-függően” megjelenő, 302 Da molekulatömegű anyagot, melynek jelenléte RALDH függőnek bizonyult, és ami valószínűleg egy dihidro-retinsav vagy apo-159-likopinsav (Aydemir és mtsai., 2013) származék lehet. A klasszikus retinsav szintézishez vezető enzimatis útvonalak mellett, nemrég egy új retinol szaturáz enzim működésével kezdődő útvonalat is leírtak. A szintén RALDH függő reakciósorozat 13,14 dihidro-retinsavak termeléséhez vezet, melyek alacsony affinitású RAR ligandok (Moise és mtsai., 2004, Moise és mtsai., 2005, Moise és mtsai., 2009). A retinol szaturáz a timuszban is jelen van, sőt

kifejeződése fokozódik az *in vivo* apoptózis indukciót követően, ami arra utal, hogy szerepet játszhat a timuszban apoptózis indukciót követően képződő retinoid szintézisében, melynek pontos kémiai szerkezete azonban még nem ismert. Az egér timusz miligrammos nagyságrendbe eső tömege elméletileg mindössze nanogramnyi mennyiségben tartalmazhat retinoidokat, melyek tömege tisztítást követően pikogrammos nagyságrendbe esne. Ezek a mennyiségek még a legkifinomultabb nmr technológiákkal sem teszik lehetővé pontos kémiai szerkezet meghatározását. Ezért az anyag pontos szerkezetének és biológiai viselkedésének tisztázására kémikus partnerek bevonásával az ismeretlen retinoid célzott organikus szintézisét kezdeményeztük, figyelembe véve valamennyi kémiai módosulat lehetőségét. Tekintettel arra, hogy a fagocita receptorok kettős: RAR- és RXR- függő útvonalak szabályozása alatt állhatnak, valószínűsíthető, hogy LXR stimulációt követően RAR és RXR aktiváló ligandok és/vagy egy RXR és RAR aktivációs potenciállal rendelkező ligand keletkezik.

Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az apoptotikus sejtek eltakarításának zavara emberekben és egerekben is SLE kialakulásához vezet, aminek a hátterében egyebek mellett a különböző fagocita receptorok elvesztése is állhat (Hanayama és mtsai., 2002, Botto és mtsai., 1998, Devitt és mtsai., 2004, Cohen és mtsai., 2002, A-Gonzalez és mtsai., 2009, Mukundan és mtsai., 2009, Szondy és mtsai., 2003). Arról is beszámoltak, hogy a fagocita receptorok genetikai hibája nélkül is megfigyelhető az apoptotikus sejtek eltakarításának zavara manifeszt SLE-ben, ami megerősíti, hogy a primer vagy szekunder fagocitózis zavar meghatározó szerepet játszhat a betegség kialakulásában (Licht és mtsai., 2004, Gaipal és mtsai., 2007). Ezért azok a hatóanyagok, melyek képesek fokozni az apoptotikus sejtek felvételét, hasznosak lehetnek az SLE kezelésében is. A glükokortikoidok például, melyeket széles körben alkalmaznak autoimmun betegségek, többek között az SLE kezelésében is, egyéb hatásaik mellett hatékonyan fokozzák a makrofágok fagocitózis kapacitását is (McColl és mtsai., 2009). LXR ligandokkal végzett kísérletek szintén azt mutatták, hogy alkalmazásuk csökkenti az SLE tüneteit lpr egerekben (A-Gonzalez és mtsai., 2009). Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a retinoidok szintén alkalmasak lehetnek hasonló célú felhasználásra. Ezt támasztják alá a retinoidokkal szerzett eddigi terápiás tapasztalatok is: Az SLE-ben szenvedő betegek gyakori halál oka a lupus nephritis és az ahhoz kapcsolódó szövődmények (Walsh és mtsai., 1995). Az *in vivo* ATRA kezelést egér modelleken már sikerrel alkalmazták is (Kinoshita és mtsai., 2003, Pérez de Lema és mtsai., 2004) sőt humán tanulmányokban is rendelkezésre állnak (Kinoshita és mtsai., 2010). Az SLE-szerű tüneteket mutató egerekben a hosszú távú ATRA kezelés hosszabb túlélést, a vesék pathológiás elváltozásainak (renális IgG depositumok, proteinuria)

mérséklődését eredményezi. A retinoidok mindemellett ismert immunmodulátor szerek. Késleltetik Az autoimmun betegségek progresszióját feltételezhetően a Th1/Th2 egyensúly valamint a T_{reg} sejtek működésének befolyásolása révén is késleltetik (Carratù és mtsai., 2012). Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a retinoidok SLE terápiában tapasztalt kedvező hatása kapcsolatban állhat az apoptotikus sejtek eltakarításának fokozásával is.

Kísérleteink két molekuláris célpontot azonosítottak, melyek befolyásolják az apoptotikus sejtek eltakarítását: a retinoidok és az adenozin receptorok.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Egészséges egyénekekben nap, mint nap sejtek milliárdjai halnak el apoptózis révén. Ha az elhalt sejtek fagocitózis útján történő eltakarítása (amit egyre szélesebb körben efferocitózisnak neveznek) nem kellően hatékony, az apoptotikus sejtek szekunder nekrozisa következik be, ami következményesen a pro-inflammatórikus sejttartalom extracelluláris térbe áramlásához, a környező szövetek károsodásához és krónikus gyulladásához vagy akár autoimmunitással járó betegségek kialakulásához is vezethet. Az efferocitózis tanulmányozása olyan gyógyszerterápiákhoz vezethet, melyek új kezelési stratégiák részévé válhatnak olyan betegségek kapcsán, ahol az elhalt sejtek eltakarításának zavara fontos pathogenetikai tényező.

Az apoptotikus sejtek eltakarításának első lépése során az elhalt sejtekből kiáramló ún. „find-me” szignálokat érzékelő makrofágok kemotaktikus migráció révén az apoptotikus sejtek közelébe vándorolnak. A vándorlás során polarizálódó makrofágok vezető oldalukon ATP-t bocsátanak ki, ami extracellulárisan ADP-re, AMP-re, majd adenozinra bomlik, majd a sejtfelszíni purinerg receptorokhoz kötődnek. Korábbi tanulmányok igazolták, hogy a kemotaktikus szignálokon kívül ezen autokrin purinerg jelátvitelre is szükség van a kemotaktikus jelek felerősítéséhez ill. irányított mozgássá alakításához (Kronlage et al., 2010). Kísérleteink első részében az adenozin A3 receptorok (A3R) szerepét vizsgáltuk a makrofágok apoptotikus timociták irányába történő kemotaktikus vándorlásának szabályozásában. *In vitro* és *in vivo* kísérleti módszerek eredményeivel támasztottuk alá, hogy az autokrin purinerg jelátvitel szükséges a makrofágok apoptotikus timociták irányába történő vándorlása során a mozgás sebességének és direkcionalitásának fenntartásához. Az adenozin receptorokhoz kötődő jelátvitel eredményeink alapján önmagában képes hatékony sejtmigrációt biztosítani, de csak abban az esetben, ha szimultán A3R és A2R aktiváció is bekövetkezik. Bár az A3R elvesztése önmagában nem befolyásolja a makrofágok fagocitózis kapacitását, az intraperitoneálisan befecskendezett apoptotikus timociták az A3R hiányos makrofágok zavart kemotaktikus navigációs képessége miatt lassabban kerültek felvételre. Eredményeink igazolják a makrofág A3R jelentőségét a kemotaktikus mozgás direkcionalitásának szabályozásában és ezzel összefüggésben az apoptotikus timociták *in vivo* intraperitoneális eltakarításának zavartalanosságában. Érdekes módon az A3R elvesztése nem befolyásolta a dexamethasone kezelést követően timuszban zajló efferocitózist.

A dolgozat második felében az elhalt sejtek bekebelezésének hátterében zajló jelátviteli folyamatok vizsgálatát célzó kísérleteink mutatnak be. Megerősítettük, hogy az elhalt sejtek lipidjei által aktivált lipid érzékelő liver X receptor (LXR) stimulációja számos efferocitózis kapcsolt molekula génje mellett az endogén retinoid produkcióért felelős enzimek génjeit is indukálja. Az endogén retinoid szintézis egy nem-klasszikus, ismeretlen retinoid termeléséhez vezet a makrofágokban. Az ismeretlen retinoid a tömegspektrometriás analízis alapján egy dihidro-retinsav származék lehet, melynek megjelenése további fagocitózis kapcsolt receptorok indukciójához, pl.: TG2, vezet a retinsav receptorok aktivációján keresztül. A retinoid szintézis gátlása az LXR stimuláció hatására bekövetkező fagocitózis fokozódás elmaradását eredményezi. Eredményeink arra utalnak, hogy az LXR aktivációt követően megfigyelhető fagocitózis fokozódás több direkt LXR és indirekt módon endogén retinoid produkcióhoz köthetően szabályozott gén megváltozott kifejeződésével áll kapcsolatban. Mindezek alapján azon kórfolyamatokban, melyekben az apoptotikus sejtek eltakarításának zavara megfigyelhető felmerül a retinoidok potenciális terápiás alkalmazása az elhalt sejtek fagocitózisának fokozása céljából.

KULCSSZAVAK: efferocitózis, makrofág, fagocitózis, adenzin, sejtmigráció

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A disszertációmban bemutatott munkát 9 évvel ezelőtt kezdtem. Akkoriban, 2008-ban, teljesítve a harmad éves vizsgáim az általános orvostudományi karon, telve lelkesedéssel és kíváncsisággal kerestem fel Szondy professzornő laboratóriumát a biokémiai és molekuláris biológiai intézetben. Nyár vége volt és én kicsit hezitáltam, jó ötlet-e máris egy újabb kihívásba kezdeni, mikor a negyed év megmérettetéseivel is hamarosan szembe kell nézzek. Mikor azonban Szondy professzornő felajánlotta, hogy munkacsoportjában az apoptotikus sejtfelvétellel foglalkozhatok, tudtam, hogy ez egy nem mindennapi lehetőség.

Lehetetlen volna és túl hosszú is az idáig vezető utam minden fontos mérföldkövét felsorolni, ehelyett szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki valamilyen formában részese volt.

Külön szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Szondy Zsuzsa professzornőnek, hogy mindig segített, támogatott, türelméért és, hogy olyan sokat tanulhattam tőle.

Köszönöm Fésüs László professzor úrnak támogatását PhD tanulmányaim során.

Köszönöm Peter Krammer professzor úrnak és munkacsoportjának, hogy csapatukba fogadtak és, hogy velük dolgozhattam Heidelbergben.

Köszönet kedves kollégáimnak és kutató partnereimnek, Dr. Sarang Zsoltnak, Dr. Papp Tamásnak, Jákim Juditnak, Dr. Szemán-Nagy Gábornak, Terdik Tündének, Dr. Ralph Rühlnek, Dr. Kiss Beátának, Dr. Felszeghy Szabolcsnak, Sággy Tibornak és Dr. Pap Attilának, akiknek a segítsége, fáradozása nélkülözhetelen volt.

Köszönöm munkacsoportunk minden tagjának, Dr. Köröskényi Krisztinának, Dr. Garabuczi Évának, Dr. Sándor Katalinnak, Duró Edinának, Dr. Pallai Annának, Dr. Tóth Katalinnak, Budai Zsófiának, Hartman Zsoltnak, Kómóczi Editnek és a többi kollégának és barátinak az intézetből (Fésüs-lab, Nagy-lab, Petrovski-lab, Szatmári-lab) segítségüket, kedvességüket.

Köszönöm az intézet és a doktori iskola vezetőinek, hogy munkám elkeszülhetett.

Köszönöm Oláh Zsuzsának és Dr. Köröskényi Krisztinának kedvességüket és önzetlen segítségüket a PhD tanulmányaimmal kapcsolatos adminisztratív ügyek intézése kapcsán.

Köszönöm biológia tanárainknak Dr. Futó Editnek és Dr. Tóth Györgynek kedvességüket és hitelességüket.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm családomnak: Anyukámnak, Apának, nővéremnek és családjának, barátaimnak és a barátnőmnek, hogy kitartottak mellettem, és akiktől végtelen támogatást, bátorítást és szeretetet kaptam ezen a hosszú, szép, de sokszor nagyon nehéz út során.

8. PUBLIKÁCIÓK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/144/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Joós Gergely
Neptun kód: VMCJC9
Doktori Iskola: Fogorvostudományi Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Joós, G.**, Jakim, J., Kiss, B., Szamosi, R., Papp, T., Felszeghy, S. B., Sággy, T., Szemán-Nagy, G., Szondy, Z.: Involvement of adenosine A3 receptors in the chemotactic navigation of macrophages towards apoptotic cells.
Immunol. Lett. 183, 62-72, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.02.002>
IF: 2.483 (2015)
2. Szondy, Z., Garabuczi, É., **Joós, G.**, Tsay, G. J., Sarang, Z.: Impaired clearance of apoptotic cells in chronic inflammatory diseases: therapeutic implications.
Front. Immunol. 5, 1-8, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00354>
3. Sarang, Z., **Joós, G.**, Garabuczi, É., Rühl, R., Gregory, C. D., Szondy, Z.: Macrophages engulfing apoptotic cells produce nonclassical retinoids to enhance their phagocytic capacity.
J. Immunol. 192 (12), 5730-5738, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1400284>
IF: 4.922



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☐ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: www.lib.unideb.hu



További közlemények

4. Sarang, Z., Garabuczi, É., **Joós, G.**, Kiss, B., Tóth, K. Á., Rühl, R., Szondy, Z.: Macrophages engulfing apoptotic thymocytes produce retinoids to promote selection, differentiation, removal and replacement of double positive thymocytes.
Immunobiology. 218 (11), 1354-1360, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.009>
IF: 3.18

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,585

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
7,405**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.05.22.

