

Doktori (PhD) értekezés tézisei

A hem indukálta endoplazmatikus retikulum (HIER) stressz vizsgálata a plakk progresszió rezidens sejtjein

Pethó Dávid

Témavezető: Dr. Gáll Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2025

A hem indukálta endoplazmatikus retikulum (HIER) stressz vizsgálata a plakk progresszió rezidens sejtjein

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Pethő Dávid okleveles biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Thrombózis, hemosztázis és a vaszkuláris biológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Gáll Tamás

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Harangi Mariann, az MTA doktora
Dr. Békési Gábor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet,
Nephrológia Tanszék könyvtára
2025. június 11. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Leiter Éva Julianna, PhD
Dr. Szappanos Ágnes, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Soltész Pál, az MTA doktora
tagok: Dr. Leiter Éva Julianna, PhD
Dr. Szappanos Ágnes, PhD
Prof. Dr. Harangi Mariann, az MTA doktora
Dr. Békési Gábor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épület tanterme,
2025. június 11. 13:00

I. Irodalmi áttekintés

1.1 Az *atherosclerosis*

1.1.1 Az *atherosclerosis* populációs incidenciája

Az *atherosclerosis* népbetegség mind a fejlett, mind a fejlődő társadalmakban és a vezető halálozási okok között szerepel világszerte. A WHO jelentése szerint több mint 17,9 millió új, illetve mint társbetegség jelenik meg és, az összes halálozások mintegy 32%-ért felelős. A mai értelemben vett *atherosclerosis* incidenciája a társadalmi fejlettséggel exponenciálisan emelkedett az elmúlt 50-60 év során. A növekvő gazdaság és az ebből fakadó jóléti társadalmak kialakulásával egyidőben a lakosság nagyrésze potenciális betegcsoporttá vált. A nyugati típusú étrend, viselkedés- és magatartásformák megváltozása úgymint az étkezési szokások, dohányzás vagy fizikai aktivitás csökkenése magával hozta az elhízás, a cukorbetegség, a magasvérnyomás és metabolikus szindrómák populációs szinten magasabb arányát. A felsorolt betegségek mind társbetegségei, vagy korai rizikófaktori az *atherosclerosis* kialakulásának. A környezeti faktorok már önmagukban is elegendőek a betegség progressziójához, ám genetikai tényezők is közrejátszanak a kialakulásban. Az *atherosclerosis* nem csak felnőttkorban megjelenő betegség, már a gyermek és a fiatal felnőtt populációt is érinti. A csecsemő és kisgyermek (29 nap-9 év), fiatal gyerek (9-19 év), valamint a fiatal felnőtt (19-25 év) populáció tagjainak előzetes radiológiai vizsgálata és *atherosclerosis* gyanúja alapján beválogatott betegek 20-50 %-ában bizonyítható volt a kórkép jelenléte. Habár az *atherosclerosis* ritka halálozási ok a gyermekeknél vagy fiatal felnőttkorban, de az eredmények arra utalnak, hogy az idősebb felnőtteknél a *stroke*-hoz kapcsolódó érelváltozások már gyermekkorban is jelen vannak, és ezen érelváltozások előfordulása az életkor előrehaladtával fokozódik. Ezért a kockázati tényezők csökkentését minél hamarabb meg kell kezdeni.

1.1.2 Az *atherosclerosis* története, felfedezése

Az *atherosclerosis* esetén nem új keletű kórképről beszélünk. Már 4000 évvel ezelőtt élő emberek mumifikált maradványiban is felfedeztek érelváltozásokat. A vizsgált alanyok 34%-a mutatott elváltozást, melyet különböző, ősi kultúrákban (egyiptomi, perui, stb.) is azonosítottak. A pathofiziológia rendellenességek érintették az aorta régiót, a csípő/femurális artériákat, a térdhajlati- és sípcsont artériákat, valamint a nyaki artériákat is, melyek előfordulása napjainkban szintén a leggyakoribb elváltozások közé tartoznak. Az *atherosclerosis* pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert, ám a korai léziók megjelenése és a kezdeti stádiumok állapota alátámasztja a „lipid hipotézis” jelentőségét. Az ezzel

kapcsolatos első kísérletes megfigyeléseket a 20. század elején egy orosz kutató, Alexander Ignatowski írta le. A tojássárgájával etetett nyulak boncolása során elváltozásokat fedezett fel az érrendszerben. Később egy szintén orosz kísérletes patológus, Nikolai N. Anichkov hasonló kísérletet végzett, csak növényi olajjal egészítette ki a nyulak étrendjét. Megfigyelései azonosak voltak Ignatowski eredményeivel. Ezen megfigyelések voltak az alapjai a mai humán populációt érintő hiperkoleszterinémiával összekapcsolt *atherosclerosis* kutatásoknak.

1.1.3 Az *atherosclerosis* biológia háttere

Ma már bizonyított, hogy bizonyos plazma lipoproteinek, mint az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) vagy a lipoprotein kis a (Lp_a), tartósan magas szintje, proatherogén hatásúak, míg a magas sűrűségű lipoprotein (HDL) antiatherogén védelmi funkciót tölthet be. Az irodalmi adatok szerint a kórkép iniciációs lépése az érfalban a lipoproteinek és sejtek közötti interakciók létrejötte, melynek során az érfal rezidens sejtjei úgy, mint az endotheliális sejtek, a simaizomsejtek, illetve a véráramból infiltrálódó monociták (később makrofágok és hízósejtek) magas lipoproteinre adott együttes válasza indítja el a plakk-képződés folyamatát. Az érfal belsejét borító endotheliális sejtek a megemelkedett lipoprotein szintekre válaszként adhéziós molekulákat (MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, SELE) szekretálnak, amelyekkel monocita migrációt váltanak ki. A monociták a szubintimális infiltrációt követően az adott szignáloknak megfelelően differenciálódnak. Feladatuk a feldúsult lipidek eliminálása, de az intima alatti pH és egyéb faktorok hatására módosult lipideket nem képesek elbontani. Az így összegyűlt makrofág sejtek összetömörülnek és úgynevezett, „habossejt” képződés folyamata figyelhető meg. A habossejtek nagyméretű, az esetek túlnyomó többségében több sejt fúziójával járó sejthalmazok, melyek beágyazódnak az szubendotheliális réteg alá, ezzel beindítva a plakk progresszióját.

1.1.4 A Möckenberg-féle klasszifikáció

Minden fent említett elváltozást, függetlenül mérettől és szervi elhelyezkedéstől, általánosságban *arteriosclerosis*nak nevezünk, viszont patológiai szempontból nézve fontos szétválasztani bizonyos csoportokat. A Möckenberg-féle osztályozás szerint ezek az elváltozások mind morfológiában, mind kiterjedésben különböznek. *Arteriosclerosis*nak nevezi a kor előrehaladtával az érfal középső rétegében (*tunica media*) meszlerakodásokkal megjelenő elváltozást. *Arteriolosclerosis*nak a 200 µm-nél kisebb artériák és arteriolák elváltozásait tekinti. Ilyen elváltozások az erek rugalmasságának elvesztése, meggyűlése és a lumen szűkület kialakulása. Az *atherosclerosis* tulajdonképpen megfelel az *arteriolosclerosis* leírásának, de az artériáknál *atheromatózis* plakkok megjelenésével is jár. Hétköznapi

értelemben, míg az *arteriolosclerosis* csak mikroszkóp alatt detektálható elváltozás, addig az *atherosclerosis* akár szabad szemmel is felismerhető. A betegség karakterizálás szempontjából fontos tudni, hogy nem egy szisztémás kórképről beszélünk, hanem inkább lokális elváltozásról. Vannak fogékonyabb (hasi, külső mellkasi, koronária, nyaki, agyi és vese) és kevésbé fogékony (belső mellkasi, máj és radiális) artériák. Az arra hajlamos erek sem egyenletes és diffúz módon mutatják az elváltozásokat sokszor egy adott éren belül sem. Annak, hogy milyen fokú és milyen gyorsaságú az elváltozás mértéke, számos hemodinamikai tényező, a nyíróerők jelenléte és más permeabilitási tényezők együttesen határozzák meg. Az viszont egyértelmű, hogy a korai fázisban diffúz lokális *intima* megvastagodás történik és kialakul a „*fatty streak*” állapot.

1.1.5 A plakkok jellemzése

Az emberi szervezetben több évtizedet vesz igénybe a léziók fibrózus plakkoká alakulása, de ha ez bekövetkezik, exponenciális felgyorsul az *atherosclerosis* folyamata. Ekkor jelenik meg az instabil fibrotikus sapka, a lipid- és a nekrotikus magok együttese, amit már komplikált lézióknak hívunk. A hisztológiai jellemzők alapján igen változatosak a léziók tulajdonságai. Egy aortán belül a korai és az előrehaladott elváltozások egyaránt jelen vannak. Az American Heart Association (AHA) egy 6 tagú osztályba sorolta a léziókat. Az úgynevezett klinikailag csendes osztályba az I-IV-ig tartozó léziók tartoznak, a klinikailag kifejeződőbe pedig a V-IV-os léziók. A klinikailag csendes léziók jellemzője, hogy a plakk progresszió már beindult, de még szisztémás panaszokat nem okoznak az ér funkciójában. A klinikailag kifejeződő léziók azonban észlelhető tünetekkel járnak a lumen szűkülése következtében. Fontos megjegyezni, hogy a VI.-os léziók a legveszélyesebbek és halálhoz is vezetnek. Itt már a plakk ruptúrált lehet, emellett hemorrágiás és trombotikus is. A ruptúrált plakkok a repedéseiken keresztül még nagyobb monocita infiltrációt okozhatnak, így hozzájárulnak további plakk növekedéshez. A trombotikus plakkok a fibrózus sapka leválásával érelzáródást okozhatnak, ami a gyakorlatban miokardiális infarktushoz és sok esetben halálhoz is vezet. A hemorrágiás plakkok a plakk belsejében lévő hemoglobin, lipid és más anyagok sejttel történő interakciója során egy öngerjesztő folyamat révén a *tunica media* oldalról simaizomsejt migrációt, káros sejt- és érburjánzást és egyéb káros folyamatokat indít be. A megváltozott belső pH és nyomáskülönbségek roncsolják az éretlen, betüremkedő ereket, és az azokból felszabaduló vörösvértestek (VVT) lízisét okozva sejtreaktív folyamatokat indít el. Az elimináló funkcióval rendelkező makrofágok peroxidokat, különböző lizáló enzimeket és mátrix

metalloproteinázokat expresszálnak a plakk belsejébe, amelyek az egész, így sérült szerkezeti struktúrát tovább gyengítik.

1.2 A vörösvérttest (VVT)

1.2.1 A VVT általános jellemző

Az emberi szervezetben legnagyobb mennyiségben előforduló sejtípus a VVT. A keringésben másodpercenként 2 millió újonnan képződött VVT lép be a csontvelőből és körülbelül ugyanennyi távozik a retikulo-endotheliális rendszeren keresztül. Fiziológias körülmények között mikroliterenként 4-5 millió VVT van jelen a teljes vérben. Élettartamuk 110-120 nap normál állapotban keringésben és a természetes elöregedés során alkotó elemeik (vas, sejtalkotók fehérjéi) recirkulációra kerülnek. A fiatal VVT-k intracelluláris foszfatidil-szerin, illetve foszfatidil-etanol-amin szignállal rendelkeznek, melyek az öregedés során a sejt felszínre kerülnek, így az elöregedett sejtek egy fagocitózis szignállal jelölve eliminációra kerülnek. Születéskor már meglévő készlettel és előalakokkal rendelkezünk, így a képződés állandóan biztosított fiziológias körülmények között. A születés után 5 évig a vöröscsontvelő biztosítja a VVT szintézist, majd a laposcsontok veszik át ezt a szerepet.

1.2.2 A VVT felépítése

A VVT-k különleges helyet foglalnak el a sejtek között, mivel felépítésük igencsak eltérő a többi sejtől. Nem rendelkeznek sejtmaggal, riboszómákkal és mitokondriummal. Bár a legtöbb eukarióta sejt életben maradásához ezek a sejtszervecskék nélkülözhetetlenek, a VVT-k számos előnnyel rendelkeznek ezen sejtszervek hiánya következtében. A sejtmag hiánya nagyobb sejterület szabadított fel, ezzel arányosan magasabb Hb tárolási kapacitást értek el, így több oxigént képesek szállítani és az élettartamuk is megnőtt. A felsorolt sejtszervecskék hiányában rugalmasabb sejtmorfológiával rendelkeznek, így a kapillárisokban is akadály nélkül tudnak mozogni. A VVT-k energiatermelése mitokondriumok hiányában közvetlen glikolízis útján zajlik a citoszólban, ahová számtalan uniporter típusú glükóz transzporter biztosítja a szubsztrátot az energiaszükséglet biztosításához.

1.2.3 A VVT képződése

Mivel a VVT sejtmaggal nem rendelkezik, így osztódásra képtelen. Az eritropoézis, azaz a VVT képződés, a csontvelőben található vérszigeteken történik. A differenciációs folyamat igen hosszú, körülbelül 1 hét, és jól szabályozott módon történik. Az érés folyamán szimultán két folyamat történik: a sejtmag fejlődése és a plazmaérés. Amennyiben már nincs szükség a

sejtmagra, a VVT aktíngyűrűjével megszorítja önmagát és két részre osztódik : az egyik rész a magfrakciónak felel meg, amely DNSben gazdag, a másik pedig a már funkciójának megfelelően működő VVT. A plazmaérés során a citoszólban megjelenik az oxigént szállító Hb. A VVT képződésnek a szöveti hipoxia az elsődleges ingere. Hipoxia hatására a vese az eritropoietin nevezetű polipeptidet szekretálja, mely a közvetlen csontvelői hatásának köszönhetően a hemopoietikus őssejtek eritocita irányba történő differenciációját indukálja. Ennek első lépése a vérszigetekben a proeritroblasztá történőérés, melyek makroblasztokká alakulnak, majd a normoblaszt fázisban beépül a Hb. Az ezt követő érési fázisok során kialakul a végleges eritocita forma, melyek kis idő elteltével aktív VVT-vé érnek. Az érés helyén megfigyelhető makrofágok támogató szereppel bírnak. Egyrészt az érés során kilökődő sejtmagokat eliminálják, másrészt pedig biztosítják a hemet az aktív Hb szintézishez.

1.2.4 A hemoglobin (Hb) jellemzése

A keringésbe kerülő érett VVT-k feladata az oxigén szállítása a tüdő felől a szervek irányába, valamint a szén-dioxid szállítása a szövetek felől a vérkeringésen keresztül a tüdőhöz. Az oxigén megkötéséért a VVT Hb-ja felelős. A Hb körülbelül a VVT-nek körülbelül 30%-át képezi. Felépítését tekintve négy, jól körbe határolt alegységből épül fel: mindegyik alegység egy globuláris fehérjeszakaszból és egy hem prosztetikus csoportból áll. A vas-protoporfirin IX, azaz a hem, szerkezetét tekintve egy Fe^{2+} központú négytagú heterociklikus gyűrűből áll. Az Fe^{2+} négy ponton a pirol gyűrűk nitrogén atomjaihoz és a globin hisztidin imidazol gyűrűjének egy nitrogénjéhez kapcsolódik. Az oxigén reverzibilis kötődése a hatodik koordinációs helyen történik.

1.2.5 A hemolízis

A hemolízis, azaz a VVT szétesése, fiziológiás körülmények között is mindennaposan előforduló folyamat. A keringésben történő hemolízis körülbelül 1-2 %-ban még normál értéknek tekinthető. Ebben az esetben a haptoglobin, mint akut fázis fehérje, megköti a Hb-t, mely így a keringésben lévő makrofágok CD163 receptorához kötődik, és endocitózist követően lebontásra kerül. A hemolízis során felszabaduló toxikus, szabad hem megkötésében több fehérje is szerepet játszik. Ilyen a hemopexin, mely a hem megkötését követően a CD91 receptoron keresztül felvételre kerül a makrofágokba, melyek eliminálják a hemopexin által megkötött hemet. Hemkötő fehérje még az albumin, mely nem specifikusan köti a hemet, valamint az alfa-1-mikroglobulin is szerepet játszik a detoxikálásba. Jelentős hemolízis során a fenti, endogén Hb/hemkötő fehérjék kapacitása kimerül, így a szabad Hb/hem komplex patológiás folyamatokat indít be.

1.2.6 Hemolízis asszociált betegségek

A VVT nem szabályos lízise során számos hemolitikus és hemorrágiás folyamattal járó megbetegedés alakulhat ki. Beszélhetünk intra- és extravaszkuláris hemolízisről, melyek leggyakrabban különböző gyógyszerek mellékhatásaként, mechanikai okok miatt, valamint infekció során alakulnak ki. Az öröklött hemolitikus állapotok leggyakrabban a hemofiliával társult hemorrágiás állapotok. A szerzett hemolitikus állapotoknál pedig az plakkban bekövetkező hemorrágia, illetve az idegrendszert érintő subarachnoidiális hemorrágia populációs szinten is számottevő.

1.2.7 A hemoxigenáz-1/Ferritin rendszer fontossága

Jelentős intravaszkuláris vérzés során a szabad hem a környező sejtekbe felvételre kerül. A hem erősen lipofil, könnyedén mozog akár aktívan, akár passzívan a sejtmembránon keresztül. A hem sejten belüli lebontását a hemoxigenáz-1 (HO-1) katalizálja. A hem lebontása oxigén igényes, melynek során a lebontott hemből vas, szén-monoxid és biliverdin keletkezik ekvimoláris mennyiségben. A felgyülemlett vasat a szabadgyök-képződés elkerülése érdekében a sejt vagy a ferritin molekula vasmagjába helyezi inaktív formában, vagy pedig ferroportin transzporterekkel keresztül az extracelluláris térbe szállítja. Genetikai vagy funkcionális HO-1 hiány következtében fokozott citotoxicitás alakulhat ki, mely akár apoptózist indukálhat. Az intracelluláris hem befolyásolhatja a sejtosztódást, a lipidmetabolizmust, valamint sejtszinten számos funkcionális zavart is okozhat.

1.3 Endoplazmatikus retikulum (ER) Stressz

1.3.1 Az ER jellemzői

Az eukarióta sejtek egyik legkülönlegesebb sajátossága a citoszólón belüli, membránnal elzárt terek jelenléte. Ez az úgynevezett kompartmentalizáció lehetővé teszi az egyidőbe történő molekuláris folyamatok megvalósulását. Ezen citoplazmatikus membránterek nagyrészt az ER teszi ki, mely a szekretált- és a transzmembránfehérjék szintéziséért felelős, valamint a fehérjék érésének folyamata is itt történik. A durva felszínű- (DER) és sima felszínű- (SER) ER-ben különböző fehérjék szintézise és érése játszódik le. A DER és az azon elhelyezkedő riboszómák a nagy mennyiségben szükséges, általános fehérjék előállításáért felelősek, melyek a szintézist követően a Golgi apparátusba kerülnek. A SER hasonló felépítésű a DER-hez, ám riboszómák nem kapcsolódnak a citoplazmatikus felszínéhez. A sejten belüli teljes fehérjeszintézis kis százalékát végzi és inkább specifikus szteroid termelő sejtekben, illetve a májban van jelen jelentős számban, ahol a detoxifikációs fehérjék szintézisét végzi.

1.3.2 Az ER stressz jelensége

A fiziológias szintet meghaladó fehérjeszekréció, illetve az ER fehérje hajtogatási hibái az ER lumenjében a nem-, vagy hibásan feltekeredett fehérjék akkumulálódását okozza, amit ER stressznek nevezünk. Az ER-re jellemzője a szigorúan szabályozott egyensúlyi állapot: ha az újonnan szintetizált, rosszul hajtogatott vagy hajtogatás nélküli fehérjék mennyisége túlhaladja az ER hajtogatási kapacitását, aktiválódnak az ER stressz szignálútvonalai. ER stresszhez vezet az ER kalcium háztartásának változása és az oxidatív stressz is.

1.3.3 Az UPR feladata

Az ER stressz jellemző folyamata az úgynevezett Unfolded Protein Response (UPR), amely egy evolúciósan erősen konzervált jelátviteli kaszkád. Az eukarióta sejtekben az UPR feladata a fehérjék megfelelő hajtogatásának biztosítása, az ER funkciók fenntartása, az ER stressz káros hatásaival szembeni védelem, továbbá az ER homeosztázisának fenntartása. Ha a stressz mértéke enyhébb vagy rövidebb idejű, és a stressz mértéke nem ér el egy küszöbértéket, a sejt túlélését elősegítve csupán a hibás fehérjék javítását vagy lebontását végző UPR aktiválódik. Ha az ER stressz mértéke fokozott vagy hosszabb ideig áll fent, az UPR automatikusan aktiválódik az apoptotikus kaszkáddal együtt, mely sejthalálhoz vezet.

1.3.4 ER stressz asszociált megbetegedések

A kóros ER stressznek szerepe van számos megbetegedésben. Ilyenek például bizonyos metabolikus kórképek, mint a hepatikus szteatózis és a hiperlipidémia, melyek IRE1 és ATF6 asszociáltak. Daganatos megbetegedéseknél az emelkedett szintű UPR aktiváció jelenléte is állhat az elváltozás háttérben, mivel a fokozott UPR működése elősegíti a daganatos sejtek adaptációs és túlélési mechanizmusát. Különböző biopsziás mintákból (agy, mell, limfóma, mielóma multiplex) fokozott mennyiségű XPB1s expressziót állapítottak meg, mely a túlélési ráta csökkenésével és a rossz prognózissal korrelált. Az ER funkció megváltozása gyakori számos neurodegeneratív betegségben is, például Alzheimer-kórban, Huntington-kórban, Parkinson-kórban, prionokkal kapcsolatos rendellenességekben, valamint amiotrófiás laterális szklerózisban. Ezek a megbetegedések összefüggésben állnak az UPR-el, ám az aggregátumok nagyrésze a citoszólban akkumulálódik és nem pedig az ER lumenében.

1.3.5 UPR útvonalak biokémiai háttere

ER stressz során adaptív szignalizációs útvonalak aktiválódnak, így a fehérje-hajtogatási képesség javul és az ER terhelése csökken. Ennek szabályozásában három, az ER membránjában elhelyezkedő szenzorfehérje vesz részt: hasnyálmirigy ER kinázszerű ER kináz

(PERK), inozitolt igénylő enzim 1 (IRE1), aktiváló transzkripció faktor-6 (ATF6). Normál körülmények között ezekhez a fehérjékhez a glükóz szabályozott fehérje 78/ immunglobulin kötött fehérje (Grp78/BiP) kapcsolódik, és inaktív állapotban tartja azokat. Ha a rosszul vagy hiányosan hajtogatott fehérjék mennyiségének megnövekszik, a Grp78 leválik a stressz kaskádot aktiváló fehérjékről, melyet a stressz szignálút vonalak aktivációja követ. Ennek az az oka, hogy a Grp78/BiP, mint dajkafehérje nagyobb affinitással kötődik ezekhez a hibás fehérjékhez, mint a szenzorproteinekhez.

1.3.5.1 PERK útvonal

A szenzorproteinek aktivációja bonyolult, önállóan és szimultán is aktiválódhatnak. A PERK homomultimerizáció és autofoszforyláció által aktiválódik, ezután foszforylálja az eukarióta transláció iniciációs faktor-2 α -alegységét (eIF2 α), ami az általános fehérjeszintézis leállításához, illetve szelektíven stresszfehérjék, mint az aktiváló transzkripció faktor 4 (ATF4) translációjának beindításához vezet. Az ATF4 transzkripció faktor transzaktiválja az UPR azon elemeit, melyek részt vesznek a fehérjék hajtogatásában, a redox homeosztázisban, autofágiát aktiválnak, szabályozzák az aminosavak metabolizmusát, valamint sejthalált indukálhatnak. Hosszan tartó és fokozott ER stressz hatására az állandósult ATF4 apoptotikus folyamatokban szerepet játszó fehérjék, mint például a C/EBP homológ fehérje (CHOP) expresszióját indukálja. A CHOP-ot alapvetően mindhárom ER-stressz szenzorprotein képes aktiválni, de elsődlegesen a PERK-en keresztül aktiválódik.

2.3.5.2 IRE1 útvonal

Az IRE1 útvonal aktivációja során az IRE1 oligomerizálódik és autofoszforylálódik, majd egy eddig ismeretlen hasítási mechanizmussal az X-boxhoz kötődő fehérje 1 (XBP-1)-et aktiválja, melynek aktív formája az XBP-1s. Az XBP-1s szimultán aktiválja az ER dajkafehérjeit és az ER-hoz kötött degradációs (ERAD) proteinek expresszióját, melyeknek feladata a hibásan hajtogatott fehérjék lebontása. A kináz funkcióval is rendelkező IRE-1 képes foszforylálni a c-Jun N-terminális kinázt (JNK), így az ER-függő apoptózist is beindíthatja. Az IRE1 aktivációját elsősorban a Grp78 IRE1-ről történő leválása szabályozza, ám irodalmi adatok alapján bizonyos másodlagos útvonalak is az IRE1 aktivációjához vezethetnek, ilyen például az IRE1 közvetlen kötődése a rosszul hajtogatott fehérjékhez.

1.3.5.3 ATF-6 útvonal

Az ATF-6 fehérje az ER-ben inaktív formában van jelen. Stresszt követően az aktivációs folyamat során az ER-ből a Golgi apparátusba transzportálódik, és ott egy intramembrán

proteolízissal hasításra kerül. Az ATF-6 citoszólikus fragmentje, ami egy leucin zipper-szerű transzkripciós faktor, transzlokálódik a sejtmagba és aktiválja azon chaperonok és enzimek expresszióját, melyek fokozzák az ER fehérje hajtogató képességét, úgy, mint a Grp78, Grp94, és kalretikulin.

1.3.6 Az oxidatív stressz és az UPR kapcsolata

Az oxidatív stressz negatív hatással lehet az ER funkciójára, melyet az ER stressz kaszkádok aktivációja követ. Az oxidatív károsodás esetén specifikus szignalizációs utak aktiválódnak, melyek közül központi szerepet játszik a magi faktor erithroid 2-höz kapcsolódó faktor 2 (Nrf2). Fiziológias körülmények mellett a citoszólban a Kelch-szerű ECH asszociált protein-1 (Keap-1) és az Nrf2 heterodimer formában vannak jelen. Reaktív oxigéngyökök jelenlétében a Keap-1 ledisszociál az Nrf2-ről, így a heterodimer szerkezetet megtörve az Nrf2 transzlokálódik a sejtmagba. A folyamat célja a protektív detoxifikáló és antioxidáns gének transzkripciójának aktivációja, úgymint a HO-1 és a szuperoxid diszmutáz-1 (SOD-1). Az antioxidáns útvonalak és ER stressz kaszkádok több ponton is kölcsönhatnak egymással, mint például az Nrf2/HO-1 szignalizáció a PERK-kel és az IRE1-gyel is. Megfigyelték, hogy az exogén módon adott szén-monoxid (CO) a PERK foszforilációján keresztül aktiválja az Nrf2 szignálút vonalat, amely HO-1 expresszióhoz vezet. Emellett a CO a CHOP expressziójának csökkentésével csökkenti az apoptózis mértékét is. Ennek tükrében a CO/HO-1 rendszer pozitív hatással lehet az ER stresszel társult érrendszeri megbetegségek kezelésében. Az oxidatív stresszválaszban fontos szerepet játszik a BTB és CNC homológ 1 (BACH1) transzkripciós faktor, mely heterodimerként képes a Nrf2 által szabályozott gének, így a HO-1 aktiválódását gátolni. Az Nrf2 magi transzlokálációja, amely az oxidatív stresszválaszt iniciálja, a BACH1 promóterhez való kötődésével szimultán zajlik, így egy valós idejű kompetíció zajlik a két fehérje között. Az Nrf2 heterodimert alkotva beindítja a stresszválasz kaszkádját, egyebek között a HO-1 expresszióját is. A promóterhez nem kapcsolódó BACH1 eltávolításra kerül a sejtmagból. Az Nrf2 szignalizáció aktivációját követően a HO-1 sejten belüli szintje megemelkedik és a hem lebontás során szabad vas keletkezik, ezzel beindítva a ferritin termelését. Korábbi tanulmányok szerint a hem stressz és a gyök jelenléte a HO-1/Ferritin rendszer aktivációja során keletkező nehéz láncú ferritin (H-ferritin) citoprotektív fehérjeként funkcionál, mivel a ferroxidáz aktivitása gátolja az oxidáns-mediálta citolízist a szabad vas megkötésével.

1.3.7 A plakkon belüli hem forrása

A plakk progresszió során a bevérzés és hemolízis eredményeképp jellemző pathofiziológia körülmények figyelhetők meg, mint például a pH eltérés, enzimatis folyamatok aktivációja és nyomás különbségek vannak jelen. Ezen tényezők hatására a VVT-k szétesnek és a szabaddá váló Hb egy gyors oxidáción megy keresztül (14. kép). A naiv oxiHb (Fe^{2+}) a környezeti tényezők hatására metHb-ná (Fe^{3+}) alakul, mely hem felszabadulással jár. Ezen oxidációs folyamat, köszönhetően az infiltrálódott monocita/makrofág sejtek által termelt erős oxidánsoknak, mint például a hidrogén-peroxid, tovább fokozódik. A metHb-ból átalakult ferrylHb ($\text{Fe}^{4+=\text{O}_2^-}$) csak pillanatnyi ideig marad meg ebben a formában, habár ez az idő is elég ahhoz, hogy fehérje szerkezete erősen deformálódjon és centrumából további hem szabadulhasson fel. A keletkező trunkált Hb erősen citotoxikus és a felszabadult nagy mennyiségű hem is káros a környező sejtekre nézve. Tézisem központi témája az *atherosclerotikus* plakkokban zajló pathofiziológiai folyamatok hemmel kapcsolatos megfigyelései és a rezidens sejteknél az ER stressz jelenlétének bizonyítása.

II. Célkitűzések

A fiziológias proteosztázis nélkülözhetetlen a sejtek normál működéshez. A normál proteosztázis fenntartása az ER-ben az UPR-en keresztül történik. Az UPR elsődleges feladata a nem megfelelően hajtogatott fehérjék javítása vagy lebontása, valamint a javító mechanizmusok kapacitását meghaladó stressz esetén a sejthalál folyamatok beindítása.

Korábbi tanulmányok felvetették az ER stressz és a vaszkuláris megbetegedések közötti kapcsolatot, beleértve az *atherosclerosis* és az oxidatív stresszt is. Közvetlen kapcsolatot találtak az UPR által kiváltott ER stressz és az *atherosclerotikus* rizikófaktorok között. A hem fontos szerepet játszik a szabadgyökök képződésében, mely ER stresszhez vezethet. Az oxidált Hb formák és szabad hem nagy mennyiségben vannak jelen a bevérzett *atherosclerotikus* plakkokban.

Hipotézisünk szerint a plakkokban jelenlévő hem ER stresszt válthat ki, melynek szerepe lehet az *atherosclerosis* patológiájában. Ezért munkánk során célul tűztük ki az *atherosclerotikus* plakkokban jelenlévő rezidens sejtek hemmel szembeni ER stressz válaszáának vizsgálatát.

Céljaink az alábbiak voltak:

I. Primer humán aorta simaizomsejt (HAoSMC) és humán aorta endotheliális (HAoEC) sejt kultúrákon vizsgáltuk a hem szerepét az ER stressz folyamatában. Kérdéseink az alábbiak voltak:

- Ha az ER stressz indukálható a vizsgált sejteknél, akkor az ER stressz mely útvonalai és milyen mértékben aktiválódnak a hem kezelése során?
- A hem által indukált endoplazmatikus retikulum (HIER) stressz gátolható-e specifikus hemkötő fehérjékkel és szabadgyök-gátló anyagokkal?
- A hem által indukált endoplazmatikus retikulum (HIER) stressz gátolható-e a klasszikus ER stressz gátlószerekkel?

II. Második lépésként a hem katabolizmusban központi szerepet játszó HO-1/Ferritin rendszer szerepét vizsgáljuk a HIER stressz folyamatában.

- A HO-1/Ferritin rendszer hiányában milyen fokú a HIER stressz lefolyása a rezidens sejtekben?

- A HO-1/Ferritin rendszer fokozott aktivációja során milyen a HIER stressz lefolyása a rezidens sejtekben?
- A hem degradáció során keletkező intermedier termékek hatással vannak-e a HIER stresszre?
- A HO-1 depléción okozta citotoxicitás kivédhető-e különböző sejthalál inhibitorok alkalmazásával rendszerünkben?

III. Harmadik lépésben pedig *ex vivo* humán szövettani mintákból származó transzkriptomikai és immunhisztokémiai vizsgálatokkal tanulmányozzuk a HIER stressz jelenlétét *atherosclerotikus* plakkokban. Ennek során az alábbiakat tűztük ki célul:

- CEA származó betegminták gyűjtése és kiválogatása az AHA osztályozása szerint a plakk progresszió csoportjainak reprezentálásához,
- Megvizsgálni a nem hemorrágiás és hemorrágiás plakkokból származó mintákban az ER stressz markerek jelenlétét RNS szinten RNS szekvenálással,
- Megvizsgálni a nem hemorrágiás és hemorrágiás plakkokból származó mintákban az ER stressz markerek jelenlétét fehérje szinten immunhisztokémia festésekkel.

III. Anyagok és módszerek

3.1 Reagensek

A kísérletekhez használt reagensek - amennyiben máshogy nem kerül jelölésre - a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) kerültek beszerzésre. A hemin-klorid törzsoldat (2 mM) sterilre szűrt 20 mM NaOH oldatban készült frissen, a kezelések napján. A hem-arginát az Orphan Europe Pharmaceutical (Puteaux, Franciaország) cégtől került beszerzésre. Az *E.coli*-ban termeltetett és ioncserélő kromatográfiával tisztított humán rekombináns alfa-1-mikroglobulin (A1M) kollaborációs partnerünk Bo Akerström és Magnus Gram (Lundi Egyetem, Svédország) biztosította számunkra. A hemopexin (HPX) pedig Ann Smith és munkatársai (Missouri Egyetem, Kansas, Amerikai Egyesült Államok) nagylelkű hozzájárulása volt.

3.2 Sejtkultúrák

A humán aorta simaizom sejtek (HAoSMC) a Cell Applications-től (San Diego, CA, Egyesült Amerikai Államok) és a Lonza-tól (Allendale, NJ, Egyesült Amerikai Államok) kerültek beszerzése. A humán aorta endotheliális sejtek (HAoEC) szintén a Lonza-tól kerültek beszerzésre. A sejtkultúrák egészséges, alapbetegségben nem szenvedő, kaukázusi donorokból származnak. A HAoSMC kultúrák alacsony glükóz tartalmú (1g/L) DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, amely 10 % főtális borjúsérummal (FBS) és 1% antimikrobiális koktéllal (PSA: 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin és amphotericin B) voltak kiegészítve. A HAoEC kultúrák endotheliális növekedési faktoral kiegészített Medium 199 (CM199) tápfolyadékban tenyésztettük ugyanazon kiegészítéssel, mint a DMEM. A kezelések a sejtek 90%-os konfluenciájának elérése után történtek. A hemmel történő kezelések antibiotikum- és sérumentes médiában végeztük. A HAoSMC sejteket 1 órán át, míg a HAoEC sejteket 2 órán át kezeltük hemmel. Kezelést követően a sejteket a kezelési térfogattal megegyező mennyiségű Ca^{2+} és Mg^{2+} tartalmú Hank-féle sóoldattal (HBSS+) mostuk kétszer. A regenerálási idő alatt a sejtek (3, 6 és 16 óra) teljes tenyésztési médiumot kaptak FBS-el és PSA-val kiegészítve. Pozitív kontrollként 1µM Thapsigargin-t használtunk, amely egy nem kompetitív szarko/endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATPáz (SERCA) gátlóként ER stresszt indukál. Az A1M és HPX kísérleteknél a fehérjéket együtt inkubáltuk a hemet tartalmazó kezelőoldatban szintén antibiotikum- és FBS hozzáadása nélkül. Óvatosan, szobahőn billegtettük őket fénytől védve 30 percen keresztül. A 25 µM hem tartalmú kezelőoldatot 12,5 µM koncentrációjú A1M-mel (két aktív hem kötőhellyel rendelkezik), valamint 25 µM HPX-nel (egy aktív hem kötőhellyel rendelkezik) egészítettük ki. Az N-acetil ciszteinnel (NAC)

történő kezeléseknél a sejteket 10 mM NAC-cal előkezeltük antibiotikumot és FBS-t is tartalmazó kezelőoldattal 1 órán át. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk tenyésztési térfogattal megegyező mennyiségű HBSS+-al. Az 1 órás hem kezelést követően a regenerálási időben is jelen volt 10 mM NAC a médiában. Ezek a kísérleteket csak HAoSMC kultúrákon végeztük el. Néhány kísérletben a HAoEC sejtek fenil-butírsav (4-PBA) és a nátrium-valproát (VPA) előkezelést kaptak 5 mM koncentrációban majd 1 órán át teljes tenyésztőmédiában voltak. Ezt követte a 2 órás hem kezelés, illetve a két különböző regenerálási idő (3 és 6 óra), mely során végig jelen voltak a médiában. A hem-arginátos (HA) kísérleteknél egy éjszakán keresztül prekondicionáltuk a sejteket 10 μ M HA-tal, majd ezt követte a 2 órás hem kezelés és az adott regenerálási idő. A bilirubin (BR) dóziszgörbe kezelést csökkentett 1% FBS tartalmú médiában antibiotikummal kiegészítve (minimalizálva az albumin nem specifikus BR kötését) 16 órán keresztül végeztük. Ezt követően a sejteket 25 μ M hemmel kezeltük. A szén-monoxid (CO) donor vizsgálatoknál a megfelelő beoldást követően (CORM-2-DMSO, CORMA1-sejtkultúrás víz) különböző dózisokban (20 és 40 μ M/) 6 órán keresztül előinkubáltuk a sejteket 2% FBS és 1% PSA tartalmú CM199-ben, majd ezt követően megtörténtek a 25 μ M-os hem kezeléseik és azt követő regenerálás.

3.3 RNS izolálás és hasított XBP1 PCR

A 6 lyukú tenyésztő edényben tenyésztett sejteket a kísérleti körülményeknek megfelelően megkezeltük és Tri-reagenssel (Zymo Research) totál RNS-t izoláltunk. Implen NanoPhotometer 50 (Biotech Hungary) műszerrel meghatároztuk az RNS koncentrációkat és reverz transzkripciót végeztünk cDNS végterméket előállítva High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kittel (Applied Biosystems Inc, CA, Amerikai Egyesült Államok). A horizontális 2-D gélelektroforézissel az XBP1 és GAPDH primerekkel előzőleg amplifikált cDNS mintákat megfuttattuk és a kapott hasított variáns mintázatról felvételt készítettünk. A képi kiértékelést ImageJ szoftverrel végeztük el és GAPDH-ra normalizáltuk.

3.4 RT qPCR

A kezeléseket követően RNS-t izoláltunk és cDNS-t írtunk át a fent említett módszerek segítségével. A CHOP (Hs00358796_g1), Grp78 (Hs00607129_gH), ATF4 (Hs00909569_g1), HO-1 (Hs01110250_m1), BVRA (Hs00167599_m1) és GAPDH (Hs02758991_g1) mRNS expressziós mintázatot vizsgált génre tervezett TaqMan Gene Expression Assay-ekkel (Applied Biosystems Inc., CA, Amerikai Egyesült Államok) végeztük el és vizsgált gének GAPDH-ra normált értékét tüntettük fel. A vizsgálatok CFX 96 Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, Amerikai Egyesült Államok) rendszeren történtek.

3.5 Kis interferáló RNS (siRNS) transzfekció

A 6 lyukú tenyésztő edényekben tenyésztett sejteket kis interferáló gén specifikus RNS-ekkel transzfektáltuk és géncsendesítettük. A hem-oxigenáz 1 (HO-1), ferritin nehéz lánc (FT-H), biliverdin reduktáz (BVRA) és nem kódoló kontroll (NC) siRNS-ek az Ambion-tól kerültek beszerzésre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok). A gyári leírásnak megfelelő protokollt használva 10 nmol/L siRNS adtunk a sejteknek oligofektamin jelenlétében 24 órán keresztül FBS és PSA mentes OptiMEMbe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA Amerikai Egyesült Államok). Ez követően a transzfektáló médiát lecseréltük és a korábban említett kezeléseket elvégeztük, majd ER stressz markereket vizsgáltunk.

3.6 Citotoxicitás vizsgálat

A 96-lyukú fekete, fluoreszcens vizsgálatokhoz használt tenyésztő edénybe helyzetük a sejteket. A megfelelő konfluencia szint elérése után (90 %) a sejteket oligofektamin jelenlétében 10 nmol/L kis interferáló szelektív RNS-el csendesítettük (FT-H, HO-1 és BVRA siRNSek). A 24 órás transzfekció elteltével a sejteket megkezeltük hemmel és az irodalomban jól ismert sejthalál gátlókkal: nekroptózis (necrostatin), apoptózis (ZVAD) és ferroptózis (ferrostatin). Ezen kívül még korábban használt ER stressz inhibitorokkal is: 4-PBA és VPA. A 24 órás kezelést követően a sejteket HBSS+-al mostuk és 30 percig 1 μ M kalcein AM-el inkubáltuk. A fluoreszcenciát 485/530 nm-en mértük.

3.7. Sejtfeltárás fehérje alapú mérésekre és Western blot

A 6 lyukú tenyésztőedényben kezelt sejteket HBSS-sel (pH 7.4) mostuk, majd szolubilizáltuk RIPA pufferrel (50 mmol/L Tris [pH 7,5], 150 mmol/L NaCl, 1% Igepal CA-630, 1% SDC, 0,1% SDS, proteáz-, és foszfatáz inhibitor). 30 percig jégen. A legyűjtött lizátumokat 16,000 x g-n, 4°C-on centrifugáltuk 15 percig. A centrifugálás után legyűjtöttük a felülúszót, mely tartalmazta a teljes sejtlizátumot leszámítva a sejtmembrán töredékeket és egyéb komponenseket. A minták fehérje tartalmát BCA protein assay kittel (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) határoztuk meg és azonos fehérje mennyiséget (30 μ g fehérje) injektáltunk a 10 vagy 12 %-os redukáló Tris-Glicin gélekre mintánként. Az elektroforézist követően a géleket 0,22 μ m-es PVDF membránra (Advansta Inc., Menlo Park, CA, United States) vagy 0,45 μ m-es nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Chicago, IL, Amerikai Egyesült Államok) transzferáltuk át. A nem specifikus antitestkötőhelyeket 5% BSA-val (borjú szérum albuminnal) vagy 5% zsírintesített tejjel blokkoltuk szobahőmérsékleten 60 percen keresztül. A blokkolást követően a membránokat 4°C-on billegően minimum 16 órán keresztül inkubáltuk az alábbi elsődleges antitestekkel:

humán ATF4, ATF6, BVRA, CHOP, eIF2 α , pEIF2 α (Ser451), FT-H, Hgb, HO-1, GAPDH és XBP1 fehérje elleni antitestek. A CHOP, a HO-1 és a GAPDH antitestek a ProteinTech-től (Manchester, M33WF, Egyesült Királyság) rendeltük. A továbbá fent említett antitesteket pedig a Cell Signaling Technology-tól (Danvers, MA, Amerikai Egyesült Államok). A célfehérjék antitestjeit azonosan 1:1000 hígítási arányban használtuk, a normalizáló fehérjét pedig 1:5000 arányban. Az elsődleges antitestekhez társuló másodlagos antitesteket 16 óra elteltével a membránra helyeztük 60 percig szobahőmérsékleten. Az antigén-antitest kapcsolódást kemilumineszcens próbával detektáltuk (Westernbright ECL HRP szubsztrát- Advansta). A kapott jelek kvantitatív emisszióját a vizsgált háztartási fehérje expressziójára normalizáltuk ImageJ szoftverrel.

3.8 Konfokális mikroszkópia

Az immunfluoreszcens festésekhez a sejteket 24 lyukú, 12mm-es üvegorongot tartalmazó tenyésztő edényben kezeltük. A sejtkezelést követően 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk a sejteket 15 percen keresztül szobahőmérsékleten. A fixálást követően PBS-el 3 alkalommal mostunk tenyésztési térfogattal azonos mennyiségben. A nem specifikus kötőhelyeket 0,3 % Triton-X és 5 %-os kecskeszérum tartamú PBS-ben blokkoltuk 60 percen át. Ezt követően 16 órán keresztül inkubáltuk a mintákat az elsődleges antitestekkel (humán Grp78 elleni monoklonális antitest – Thermo Fisher Scientific és humán HO-1 elleni antitest – Protein Tech). Másnap a fluorofórral jelölt másodlagos antitesteket helyeztük a mintákra (Grp78-zöld- Alexa Fluor 488 egérben termeltetett humán IgG ellenes és HO-1-piros-Alexa Fluor 568 nyúlban termeltetett humán IgG ellenes) 60 percig szobahőmérsékleten. A sejtmag vizualizálásához Hoechst festéket használtunk 10 perces inkubációval a másodlagos antitesttel történő inkubálás után. A mintákról a felvételeket Leica Microsystems nagyfelbontású konfokális mikroszkópjával készítettünk.

3.9 Szövetminták

A vizsgálati minták nem egyedi betegek kórtörténetén alapszik, hanem olyan csoportokat választottuk ki, ahol egészséges alanyokban és *atherosclerosis* miatt CEA-án átesett betegeknél vizsgálhatjuk a HIER stressz folyamatát. A CEA minták a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Sebészeti Klinika, Érsebészeti Tanszéke biztosította számunkra. A mintagyűjtést a Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, Regionális és Intézményi Kutatásértékelési Bizottsága hagyta jóvá az alábbi engedély szám alatt: DE OEC RKEB/IKEB 3712-2012. A donorok írásos tájékoztatást kaptak a mintavételről és beleegyezésüket adták azok felhasználásához. A

mintákat az AHA útmutatója alapján patológus osztályozta: I.es típus (egészséges), IV.es típus (atheróma) és VI.os típus (komplikált lézió) csoportok szerint.

3.10 Immunhisztokémia

A vizsgálathoz használt *CEA* artéria mintákat 4%-os formaldehid oldatban fixáltuk 1-3 napig a minta méretétől függően. Ezt követően egy dekalcinálási folyamat következett, majd a további immunfestést a Patológia Intézet munkatársai végezték el. A 3-5 μm vastag fixált érseletekben kérésünkre CHOP, Grp78/BIP, SMA és H&E festést készítettek. A felvételeket fénymikroszkóp, illetve ahhoz kapcsolódó kamera rendszerrel rögzítették. A mintákon készült festések relevanciáját patológus kolléga határozta meg.

3.11 RNS szekvenálás

A humán *CEA* mintákból (n=5) totál RNS-t nyertünk ki a fent említett módszerrel. A minták minőségi validálása Agilent Bioanalizátorral történt az Eukarióta Totál RNS Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével. A könyvtárkészítéshez a nyolcnál nagyobb RNS integritás számmal rendelkező minták kerültek be. A szekvenálási folyamatot kollaborációs partnerünk az Illumina NextSeq500 készülékkel végezte 75 cikluson át tartó protokollal. A szekvenálás nyers eredményei elérhetőek az NCBI SRA adatbázisában PRJNA594843 számmal ellátva. A számunkra releváns gének hőtérképet és pont diagrammjaikat statisztikai elemzést követően kollaboráció partnerünk rendelkezésünkre bocsájtotta.

3.12 Statisztikai analízis

A GraphPad Prism 5.13 szoftverrel végeztük az adatok statisztikai elemzést. Az eredményeket $\text{átlag} \pm \text{standard hiba}$ változóval ábráztuk. A statisztikai analízishez egyponthoz mért ANOVA *posthoc* Bonferroni algoritmust használtunk (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

IV. Eredmények

4.1 Az endoplazmatikus retikulum stressz jelenléte az *atherosclerosis* pathofiziológiájában

Az ER stressz és bevérzés közötti kapcsolatot *CEA*-ból származó mintákon vizsgáltuk, melyek a plakk progressziójának különböző állapotait (ateróma és bevérzett plakk) reprezentálták, melyeket egészséges kontroll mintákkal hasonlítottunk össze. Az immunhisztokémiai festés során a simaizom aktin (SMA), a Grp78 és CHOP fehérjét vizsgáltuk. Vizsgálataink alapján az egészséges érfal csekély mennyiségű Grp78 és CHOP festődést mutat. Az ateróma metszetén jól látható a lipid lerakódások körül mobilizálódó simaizomsejt réteg, ám az ER stressz markerek expressziója a kontroll érfaléhoz hasonló mértékű. A ruptúrált, bevérzett komplikált lézió mintáiban magas immunopozitivitás látható mind Grp78, mind CHOP tekintetében. A nagyobb nagyítású képen az aktiválódott simaizomsejtek citoszólikus Grp78, illetve citoszólikus és magi transzlokációt mutató CHOP festődést mutatnak.

4.2 A bevérzett plakkokban jelentős mennyiségű szabad hem figyelhető meg

A *CEA* mintákból fehérjét nyertünk ki Western blot és spektrofotometriás mérésekhez. A vizsgálatok során detektáltuk, hogy az egészséges mintákhoz képest a komplikált léziókban kereszt kötött hemoglobinformák vannak jelen, melyek a hemoglobin oxidációjának folyamatát erősítik meg. Az oxidáció során hem felszabadulás történik. A spektrofotometriás mérések alapján a komplikált léziókban szignifikánsan magasabb ferriHb és hem tartalom mérhető. Ennek tükrében bizonyítottuk, hogy a plakk belsejében magas hem koncentráció van jelen.

4.3 A hem idő- és dózisfüggő módon aktiválja az ER stressz PERK karját humán aorta simaizomsejteken

Az ER stressz PERK karjának hem hatására történő aktivációját HAoSMC sejteken elsőként a CHOP expresszió nyomon követésével vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a hem dózis- és idő függvényében CHOP mRNS szintű aktivációt eredményez. Szignifikáns növekedés a legkorábbi, 3 órás időpontban a legszámottevőbb, majd az idő függvényében a hem által kiváltott CHOP expresszió csökkenő tendenciát mutat. Mivel CHOP expressziót az ER stressz IRE1 és ATF6 karjának aktivációja is kiválthat, ezért vizsgáltuk két, a PERK által szabályozott fehérje poszttranszlációs- és génexpressziós változásait. A PERK kar aktivációját az eIF2 α Ser51 foszforilációja és fokozott ATF4 expresszió követ. Kimutattuk, hogy az ATF4 RNS- és fehérjeszinten is kifejeződik idő- és dózisfüggő függvényében. Az ATF4 expressziója 3 és 6 órával a hem kezelést követően kifejezett, míg 16 óra elteltével a kezeletlen kontroll szintjére csökken a

hem-kezelt sejtekben. Az eIF2 α foszforilációja a kaszkád korai szakaszában (3 óra) fokozott, majd a kontroll szintjére csökken.

4.4 Az ER stressz IRE1 kar hem indukált aktivációja idő- és dóziszfüggő aktivációja humán aorta simaizomsejteken

Az IRE1 kar hem hatására történő aktivációját RNS és fehérje szinten a hasított XBP1 (XBP1s) megjelenésével követtük nyomon a HAoSMC sejteken. Kimutattuk, hogy az XBP1s RNS mennyisége idő- és dóziszfüggő módon változik hem hatására mind RNS, mind fehérje szinten. Fokozott XBP1s expresszió a hem kezelést követően 3 órával a legmagasabb, majd ezt követően a kontroll szintre csökken.

4.5 A hem idő- és dóziszfüggő módon indukálja az ER stressz ATF6 karját humán aorta simaizomsejteken

Az ATF6 fehérje hasítással aktiválódik, melyet a teljes hosszúságú ATF6 fehérje expressziójának mérésével követtünk nyomon immunoblot technikával. Kimutattuk, hogy a hem idő- és dóziszfüggő módon fokozza az ATF6 hasítását HAoSMC sejteken, mely az ATF6 kar aktivációjára utal. Az ATF6 hasítása 3 óra után a legerőteljesebb és 6 óra elteltével is jelentős mértékű. 16 óra elteltével közel bazális szintre áll vissza a fehérje expressziója, de a legmagasabb koncentrációjú hemnél még némi fogyás látható.

4.6 A hem idő- és dóziszfüggő módon indukálja az ER „mester regulátor” Grp78-t, valamint a hem katabolizmusban szerepet játszó HO-1/Ferritin expresszióját humán aorta simaizomsejteken

A Grp78 az ER stressz központi mester regulátora, így vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a hem a Grp78 expresszióját HAoSMC sejteken. A hem kezelést követően már 3 óránál szignifikáns génexpressziót láttunk már a legalacsonyabb hem dózis (1 μ M) esetén is. A legmagasabb Grp78 expressziót RNS szinten 6 órával a hem kezelést követően detektáltuk, az Grp78 RNS szintű expressziója ezt követően csökkent. Fehérje szinten a Grp78 expresszió 6 és 16 óra elteltével is emelkedett volt. Ezt követően vizsgáltuk a hem katabolizmusában szerepet játszó két fehérje, a HO-1 és a ferritin nehézlánc (H-ferritin) expresszióját. A hem valamennyi vizsgált koncentrációban, idő- és dóziszfüggő módon aktiválta a HO-1 génexpresszióját, valamint a HO-1/H-ferritin fehérje szintű expresszióját

4.7 A hemopexin és alfa-1-mikroglobulin hemkötő fehérjék csökkentik a HIER stresszt humán aorta simaizomsejteken

Az alfa-1-mikroglobulin (A1M) és hemopexin (Hpx) védelme a hemmel való kelátképző tulajdonságukban rejlik. A hem és a hemoproteinek közötti kémia reakció lehetővé teszi azt, hogy az extracelluláris hem ne léphessen interakcióba a sejttel. A hemkötő fehérjék hemmel szembeni hatását vizsgáltuk az UPR útvonalak aktivációjára nézve. Ezekhez a kísérletekhez a sejtek hem-fehérje komplexekkel kezeltük, ahol ekvimoláris mennyiségben hemkötő helyre korrigálva használtuk a hem mellé az adott akutfázis fehérjéket (25 μ M hem + 12,5 μ M A1M / 25 μ M Hpx). Vizsgáltuk az IRE1-, PERK- és ATF6 útvonal résztvevőit, hogy milyen mértékben változnak a hemkötő fehérjékkel kiegészített kezelésnél. A szakasz első felében az mRNS alapú változásokat reprezentáljuk, melyeket két időpontnál vizsgáltunk, mindkét hemkötő fehérje jelenlétében. A mérésekből látható az IRE1 útvonal két eleme: az ATF4, a CHOP és az adaptációs mechanizmusban résztvevő Grp78 és HO-1 génexpressziók markáns csökkenést mutatnak az önmagában hemmel kezelt sejt válaszához képest. A hemoproteinek védelme a korai 3 órás és kései 16 órás időpontban egyaránt szignifikánsak maradtak. A szakasz második felében a fehérjeexpressziós mintázatot vizsgáltuk PERK/IRE1/ATF6 tekintetében, illetve az IRE1 mediálta XBP1 hasítását a fent említett kondíciók mellett. A hasított XBP1 mintázata mutatja, hogy az útvonal a hemoproteinekhez kötött hem mellett nem aktiválódik. Mindkét fehérje azonos védelmet nyújtott a hem által kiváltott hatás ellen. A génexpressziós mintázatokhoz hasonlóan a fehérjeexpresszió is követte a gátlás mechanizmusát ATF4/Grp78/XBP1 és HO-1 fehérjék esetén is. Az eIF2 α fehérje foszforilációja és az ATF6 fehérje proteolitikus hasítása sem következett be az A1M és a Hpx jelenlétében. Összeségében elmondható, hogy az A1M és Hpx képes gátolni az ER-t provokáló hem hatását a vizsgált sejteken.

4.8 A hem, mint szabadgyök generáló vegyület hatásának kivédése N-acetil-ciszteinnel

Irodalmi adatok alapján a kórosan feldúsuló szabad hem szabadgyökök felszabadulását okozza, ezzel szélsőséges esetben sejthalált indukálva a sejtekben. Az N-acetil-cisztein (NAC) egy széleskörben használt antioxidáns, mely gyökfogó hatásának köszönhetően képes a hem okozta káros szabadgyök-hatást gátolni. Munkánk során vizsgáltuk, hogy a NAC képes-e a HIER stressz gátlására. Eredményeiből látható, hogy a NAC kezelés hatékonyan csökkentette a vizsgált ER stressz markerek expresszióját.

4.9. A plakk bevézése fokozza az ER stresszt CEA-ból származó mintákban

In vitro vizsgálatainkat követően munkánkat humán érmintákra is kiterjesztettük. Így CEA-ból származó egészséges érmintákat, aterómából és bevézett plakkból származó mintákat RNS szekvenálással vizsgáltunk. Az ebből készült hőtérképből láthatjuk, hogy az ER stressz gének magas szinten expresszálódnak (ATF5, CALR, CANX, ATF6, CHOP, Grp78, HSP90B1), míg mások, melyek a szignálút vonal korai szakaszában aktiválódnak (DNAJB9, XBP1, EIF2AKA3, ATF4) csökkent expressziót mutatnak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az ER stressz folyamata dinamikusan változik a plakk progressziója során és a bevézés, illetve az ott feldúsuló hem markánsan modulálja az ER stressz folyamatát.

4.10 Az ER stressz markerek expressziója fokozódik endothélsjtekben a plakk progresszió során

Az RNS szintű vizsgálatainkat követően, a CHOP és Grp78 markerek nyomon követésével, azt vizsgáltuk, hogy a plakk progressziója során hogyan változik-e az ER stressz markerek expressziója az érfal egy másik rezidens sejtje, az endothélsjtek esetén. Immunohisztokémiával kimutattuk, hogy mind a friss bevézésnél, mind az idült bevézésnél fokozott expresszió figyelhető meg az egészséges és a bevézés nélküli aterómához képest a Grp78 és CHOP esetén egyaránt. Mi több, a friss és idült bevézés helyén létrejövő, neovaszcularizált kis erek endothél sejtjei is pozitív festődést mutatnak. Kutatócsoportunk kimutatta, hogy a bevézett plakkok nagy mennyiségben tartalmaznak oxidált Hb formákat, illetve ezen Hb széteséséből hatalmas mennyiségű hem szabadul fel. Ennek kapcsán tovább vizsgáltuk a HIER stressz jelenségét in vitro humán aorta endotheliális (HAOEC) sejteken. Immunfluoreszcens festéssel kimutattuk, hogy a hem fokozza a HO-1 és az ER stressz marker Grp78 expresszióját HAOEC sejteken, mely alátámasztja a HAoSMC sejteken végzett megfigyeléseinket ezen sejt típus esetén is.

4.11 ER stressz karok vizsgálata HAoEC sejteken HIER stressz esetén

Azt követően, hogy megbizonyosodtunk a téma klinikai relevanciájáról, miszerint a bevézés indukálta ER stressz folyamatának szerepe van az ateroszklerózis progressziójában, in vitro HAOEC sejteken modelleztük a HIER stressz jelenségét. Hemolitikus körülmények között a hem magas koncentrációban (akár 100 μM) kerül a plazmába. In vitro, HAOEC sejteken végzett vizsgálataink alátámasztották az érmintákon tett megfigyeléseinket, mivel sejt kultúrás modellen már 10 μM hem képes indukálni az ER stressz mechanizmusát. A sejtek kezelése emelkedő dózisú hemmel történt (10,25 és 50 μM). A génexpressziós mintázat hasonló választ adott a HAoSMC sejtekhez, már a korai időpontban dózis- és időgörbe figyelhető meg CHOP és Grp78 tekintetében.

Fehérjeexpressziós mintázat alapján is dózis- és időgörbe figyelhető meg valamennyi ER stressz marker esetén. Az ER stressz karok egy-egy jellegzetes markerét (Grp78, XBP1s, CHOP) vizsgálva láthatjuk a szignálútvonal bekapcsolását, illetve a HO-1/FT-H rendszer aktivációját is. Egy másik kísérleti körülményben, arra voltunk kíváncsiak, hogy a HIER stressz szérumszámfüggő folyamat-e. A szérumszám önmagában tartalmaz direkt és indirekt hemkötő fehérjéket, mint az albumin vagy az alfa-1-mikroglobulin. A változó szérumszámú kondíciók rávilágítottak arra, hogy működhet-e az ER stressz egy iszkémiás állapotban, illetve egy csökkent vérellátottságú, de hemolitikus régióban. A HAOEC sejteket 50 μ M hemmel kezeltük 3,6 és 24 órás időgörbe felvételével egy alacsony (1%) és egy magasabb (5%) szérumszámú médiában. A génexpressziós vizsgálatok alapján a HO-1/FT-H rendszer közel azonos választ adott szérumszámától függetlenül. Azonban az ER stressz markereknél láthatjuk, hogy CHOP és a Grp78 expresszió mértéke jelentősen eltér. Az alacsony szérumszámú közegben többszörös indukció figyelhető meg a sejthalálért felelős CHOP-nál. A Grp78 indukció pedig még 24 óra elteltével is aktív, mely arra enged következtetni, hogy a fehérje protektív dajkafunkciója révén küzd a magas fokú hem okozta stresszel. A magasabb szérumszámú közegben alacsonyabb a HIER stressz mértéke, nagyobb aktivitást csak 6 óránál észleltünk. Ezt követően visszaáll a bazális szintre az expresszió. A fehérje expresszió mintázata hasonló tendenciát mutatott, mint a PCR eredmények. Meglepő módon a szérumszám jelenlétében az XBP1 aktivációja, így a hasított XBP1s számottevően csökkent a CHOP expresszióhoz képest, amely még 24 óra után is detektálható a hem folyamatos jelenléte mellett.

4.12. HIER stressz gátlása klasszikus ER stressz inhibitorokkal

Irodalmi adatok szerint az ER stressz bizonyos kémiai chaperonok alkalmazásával kivédhető. A fenil-butírsav (4-PBA) és a nátrium-valproát (VPA) széleskörben használt inhibitorok. Feltételezésünk alapján a HIER stressz folyamatában is kifejthetik gátló hatásukat. Kísérleteink során a HAOEC sejteket egy éjszakán át előinkubáltuk az említett kémia chaperone-okkal: a teljes tenyésztő médiát (10 % FBS és 1 % PSA tartalmú CM199) 5-5 mM VPA-tal és 4-PBA-tal egészítettük ki. Ezt követően a HIER stressz indukáltuk 25 μ M hemmel szérumszám és antibiotikum mentes médiában 2 óráig, majd a 3 és 6 óra teljes médiás regeneráció után feltártuk a sejteket. A fenil-butírsav, mint alacsony molekula tömegű kémia chaperone képes kivédeni a fehérjék rendezetlen feltekeredését megóvva ezzel az ER-t a stressztől. A nátrium-valproát széleskörben használt stressz inhibitor számos stresszorral szemben. Eredményeink azt mutatják, hogy sem a VPA, sem a 4-PBA nem volt képes teljes mértékben kivédeni a HIER stresszt 3 óta után. A gén- és fehérjeszintű elemzésből kiderült, hogy a vizsgált chaperonok nem képesek csökkenteni a sejthalálhoz vezető CHOP aktivációt, ellenben a protektív szerepű Grp78 és HO-1 indukcióját

szignifikánsan csökkentik. Az utóbbi megfigyelésünket alátámasztja, hogy irodalmi adatok szerint a VPA csökkenti a Nrf2- Keap1 útvonal aktivációját. Hasonlóan a 3 órás mérésekhez, a HO-1 és Grp78 indukciót ugyanúgy csökkentették a klasszikus ER stressz gátlók, ellenben emelték a CHOP indukcióját mind gén, mind fehérje szinten a 6 órás időpontnál is. Összeségében elmondható hogy a VPA és 4-PBA csökkentette a protektív Grp78 indukcióját. A VPA hatékonyabbnak tűnik az hasított XBP1 aktivációjánál, de mindkét gátló szignifikánsan magasabb CHOP expressziót eredményezett.

4.13 HO-1/Ferritin rendszer vizsgálata HIER stressz esetén HAOEC sejteken

A hem stresszel szemben védelemben, a hemkötő fehérjék mellett, központi szerepet játszik a hem lebontását végző HO-1/H-ferritin rendszer. Következő kísérletinkben a HO-1/H-ferritin rendszer hiányában történő változásokat követtük nyomon a HO-1 és H-ferritin szelektív csendesítésével. Kísérleteink azt mutatták, hogy hem kezelést követő 3 órával a HO-1 fehérje hiánya drasztikus ER stressz marker emelkedést mutatott a vad típusú sejtekkel szemben, ellenben a H-ferritin csendesítése kiütése nem eredményezett szignifikáns emelkedést a kontroll sejtekhez képest. Egy későbbi időpontot vizsgálva azt figyeltük meg, hogy a HIER stressznél vizsgált 16 órás regenerálódási idővel ellentétben a sejtszintű stresszválasz nem csökken, inkább emelkedésnek indult. Összeségében elmondható, hogy mind a korai, mind a kései fázisokban markáns ER stresszt láthatunk. Érdekes módon csak a HO-1 hiánya okozott ilyen szintű emelkedést, a H-ferritin hiányában nem történt változás. Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a HO-1/H-ferritin rendszer indukciója nem toxikus, a klinikumban használatos hem-argináttal protektív-e a HIER stresszel szemben. Kimutattuk, hogy a hem-arginátos előkezelés szignifikánsan védett a HIER stressz korai és kései fázisában is egyaránt.

4.14 Hem degradáció intermedierjeinek vizsgálata a HIER stresszben HAOEC sejteken

A meglévő kísérletes eredményekből az jól látható, hogy a hem indukálta ER stressz HO-1 hiányában fokozódik, illetve egy emelt HO-1 szint mellett kivédhető jelenség. Továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a hem katabolizmus során felszabaduló köztitermékek közül van-e valamelyik befolyással a HIER stressz lefolyására. Először a hem degradáció másik központi enzimét, a biliverdin reduktázt (BVRA) vizsgáltuk. Kis interferáló RNS-el történő géncsendesítést követően hemmel kezeltük meg a sejteket és ER stressz markereket vizsgáltunk. A kísérleteket szimultán végeztük a HO-1 géncsendesítéssel, összehasonlítva a két depléciót. Kimutattuk, hogy a HO-1 hiánnyal ellentétben a BVR hiánya nem fokozta a stressz markerek emelkedést. Ebből fakadóan az aktív HO-1 mennyisége a limitáló faktor a rendszerünkben, nem pedig a BVR hiánya.

A bilirubin, mint a hem katabolizmus intermedierje, széleskörben gátol számos endotheliális sejteket érintő stressz mechanizmust. Mivel a BVR hiányának nincs befolyása a HIER stressz lefolyására, ezért megvizsgáltuk, hogy az exogénean adott bilirubin dóziszfüggő módon hatást gyakorol-e a folyamatra. Kísérleteinkben ugyanazt a hatást láttuk, mint a BVR csendesítése során. A bilirubin nem fejtett ki se pozitív, se negatív hatást a HIER stressz lefolyására. A hem degradáció során felszabaduló szén monoxid (CO) hatásait vizsgáltuk utoljára rendszerünkben. Irodalmi adatok szerint a CO, mint gáztranszmitter, számos jelátviteli útban résztvevő molekula, mely anti-inflammatorikus és anti-apoptotikus tulajdonságokkal rendelkezik. Ebben a kísérletben a CO indukálta HO-1 indukciót szeretnénk volna reprezentálni, amely vélhetően sikeresen képes kivédeni a HIER stressz kialakulását. Két különböző CO-donor molekulát használtunk, melyek közül az egyik egy gyors (CORM-2), míg a másik egy lassú (CORMA1) gáz kibocsátási kinetikával rendelkezik. Összehasonlítva a két különböző CO-donor molekulát elmondhatjuk, hogy a CORM-2 mely gyorsabban kibocsátási sebességgel működik, hatásosabbnak bizonyult a HIER stresszel szemben a CORMA1-nél. Szignifikáns különbséget mutat mindkét molekula, habár a CORM2 hatékonyabb választ adott. Meglepetésünkre az irodalmi adatok ellenére a CO donor molekulák csak minimális HO-1 indukciót váltottak ki a sejteken, illetve hemmel történő együttes kezelés során a HO-1 választ kis mértékben csökkentették is.

4.15 HO-1 hiányos állapot okozta sejthalál gátlása

A HO-1 deficiencia - mely lehet veleszületett, vagy a funkcionális enzimaktivitás csökkenése - drámaian megnöveli a sejtek érzékenységet a hem irányában, ezzel csökkentve a sejtek viabilitását és szélsőséges esetekben sejthalált is okozhat. A protektív HO-1 rendszert nem csak a hem képes aktiválni, hanem a bilirubin szintézisért felelős BVR is, illetve a vas által aktivált ferritin is. A következő kísérletekben ennek a két enzimnek a sejtek viabilitásban játszott szerepét vizsgáltuk. A HO-1 géncsökkentett sejtekben aktiválódó BVR és H-ferritin képes-e kompenzálni a feldúsult szabad hem okozta negatív hatásokat. Ezt kiegészítve specifikus sejthalál induktorokat adtunk a HO-1 depletált sejteknek. Eredményként azt kaptuk, hogy a HO-1 csökkentés körülbelül 40%-os sejtpusztulást eredményez a hem expozíció követően. A BVR és a FT-H csökkentés nem okozott változást a sejtek viabilitásában. A HO-1 depléción okozta sejthalál kiküszöbölése érdekében az ismert sejthalál gátlók úgy, mint nekroptózis (Necrostatin), apoptózis (ZVAD) és ferroptózis (Ferrostatin) inhibitorok nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket. Kipróbáltunk még 2 klasszikus ER stressz gátlót is (VPA/4-PBA), ám ahogy az ER stressz markerek csökkenését se tudták befolyásolni úgy a sejthalált se tudták kivédeni. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy nincs ismert inhibitor a HO-1 deficienciában felmerülő hem toxicitás ellen.

V. Új megállapítások

Kutatásunk az ER stressz *atherosclerotikus* plakkokban lezajló folyamatait vizsgálja *in vitro* és *ex vivo* körülmények között. Fókuszunkban a plakk hemorrágia során felszabadult kóros mennyiségű hem hatásának vizsgálata volt az ER stressz tekintetében a vaszkulátúra rezidens sejtjeinél. Sejt- és molekuláris biológiai módszerekkel megvizsgáltuk, hogy az UPR útvonal PERK, IRE1, ATF6 aktiválódnak-e.

Eredményeink alapján a következő új megállapításokat tettük:

1. *In vitro* kísérleteinkben a vizsgált sejteknél az ER stressz indukálható és hem jelenlétében az UPR útvonal PERK, IRE1, ATF6 ágai aktiválódnak, melyet mind transzkripciós, mind translációs szinten alátámasztottunk.
2. A hem indukált endoplazmatikus retikulum (HIER) stressz gátolható az indukáló ágens, vagyis a hem hemkötő fehérjékkel (hemopexin, alfa-1-mikroglobulin) történő megkötésével, de a klasszikus ER stressz gátlók (VPA, 4-PBA) csak kis részben gátolták a folyamatot.
3. A HO-1/Ferritin rendszer hiánya fokozza, aktivációja pedig csökkenti a HIER stressz mértékét a vizsgált sejtekben.
4. A hem degradációs intermedierek közül csak a CO volt pozitív hatással a HIER stressz csökkentésére.
5. A HO-1 deplécio okozta hem-stressz mediálta sejthalált az általunk használt inhibitorok nem voltak képesek gátolni.
6. *Ex vivo* humán szövetmintákból készített transzkriptomikai vizsgálat és immunhisztokémiai festések alátámasztották, hogy a plakk hatodik stádiumában, a hemorrágiás plakkoknál fokozott az ER stressz jelenléte, a vérzés nélküli korábbi stádiumokhoz képest.

VI. Összefoglalás

Az ER az eukarióta sejtek proteosztázisában kulcsszerepet játszik. Normál működése elengedhetetlen a sejten belüli folyamatok lezajlásához. A hibás fehérjék úgy, mint: a nem, rosszul vagy részben hajtogatott proteinek akkumulációja az ER lumenben ER stresszhez vezet. Ezen felhalmozódás az UPR-t azaz, a „sejlt fehérje válasz” három ágát aktiválja: az IRE1, a PERK és az ATF6 útvonalat. A szenzorfehérjék aktivációját követően az UPR feladata a stresszhez mérten a javító mechanizmusokat bekapcsolni, illetve az apoptózis folyamatát beindítani.

A fokozott és/vagy tartós ER stressznek szerepe van számos megbetegedésben. Metabolikus kórképekben, mint a hepatikus szteatózis és a hiperlipidémia (IRE1 és ATF6 mediálta folyamatok), daganatos megbetegedéseknél, ahol emelkedett szintű UPR aktivációnak köszönhetően fokozott mennyiségű XPB1s expressziót állapítottak meg daganat biopsziás mintákból (agy, mell, limfóma, mielóma multiplex), illetve neurodegeneratív betegségeknél (Alzheimer-kórban, Huntington-kórban, Parkinson-kórban), ahol az ERAD és ATF6 jelátviteli kaszkád elemei a feldúsult fehérje aggregátumokkal rendellenes kölcsönhatásba lépnek. Patológiás hemolitikus állapotoknál az extracelluláris, szabad Hb egy gyors oxidációs folyamaton megy keresztül, mivel az elimináló akut fázisfehérjék telítődnek. A masszív intravaszkuláris vérzés során a szabad hem a környező sejtekben felvételre kerül. Mivel erősen lipofil tulajdonsággal rendelkezik, könnyen mozog akár aktívan, akár passzívan a sejtmembránon keresztül. A környező rezidens sejtek magas fokú stressznek, akár több száz mikromol mennyiségű hemnek is ki vannak téve. A hemstressz számos humán megbetegedés közvetlen vagy közvetett etiológiai tényezője, úgymint: szerv- és szövetkárosodások, malária, subarahnoidiális hemorrágia, rhabdomiolízis veseelégtelenséggel párosulva, sebészeti beavatkozáskor vagy transzfúziókor jelentkező komplikációk, öröklött hemolitikus szindrómák, sarlósejtes anémia, szepszis okozta hemolízisek, valamint *atheroscleroticus* plakk ruptúra. Ezen kórképekben a hem mind magas koncentrációval van jelen. Habár a hem nélkülözhetetlen az oxigén- és elektrontranszport rendszereknél, mint prosztetikus csoport a hemoproteinekben (Hb, mioglobín, citokrómok), a nagy mennyiségű szabad hem prooxidáns, proinflammatorikus és citotoxikus hatásokat okoz. Evolúciósan jól konzervált sejten kívüli (hemopexin, alfa-1-mikroglobin) és sejten belüli (HO-1/Ferritin rendszer) detoxifikációs mechanizmusok ismertek a magas szabad hemmel szemben.

Számos korábbi tanulmány felvetette, hogy az ER stressz és a vaszkuláris megbetegedések között szoros kapcsolat áll, beleértve az *atherosclerosis* és az oxidatív stresszt is. Ezek a tanulmányok direkt kapcsolatot találtak az UPR által kiváltott ER stressz és *atherosclerotikus* rizikó faktorok között. A szabad koleszterol, 7-ketokoleszterol, LDL és oxidált LDL fokozta az ER stressz kifejeződését a vaszkulátúra rezidens sejtjeiben (makrofágok, endotheliális sejtek, simaizom sejtek). A hemorrágiás plakk belsejében a megváltozott belső pH és nyomáskülönbségek roncsolják az éretlen betüremkedő ereket, és az azokból beérkező VVT-lízisét okozva óriási mennyiségű hem szabadul fel. A szubendotheliális réteg alatt megjelenő magas hem akkumulációnak elsősorban az endotheliális sejtek, illetve a *tunica media* oldalról oda vándorolt simaizom sejtek vannak kitéve. A dolgozat alapjául szolgáló publikációkban kísérletes körülmények között vizsgáltuk a humán aorta endotheliális sejtek és humán aorta simaizomsejtek hem jelenlétében megfigyelhető ER stresszét, melyet hem indukálta endoplazmatikus retikulum stressznek (HIER stressz) nevezünk el.

A sejteket hem dózis- és időgörbe függvényében vizsgáltuk *in vitro*. Az UPR három karjának központi fehérjéit vizsgáltuk mind transzkripció, mind transláció szinten. Az IRE1, a PERK és az ATF6 útvonalak vizsgálata során azt figyeltük meg, hogy RNS-, és fehérje szinten is aktiválódnak a karok. Mindhárom kar szimultán aktivációját figyelhettük meg hem kezelés hatására, ahol emelkedett szinten jelent meg a PERK útvonal központi effektor fehérjéi: a CHOP és az ATF4. Az IRE1 útvonal XBP1 hasítási mintázatát követve szignifikánsan magas XBP1s hasított formát detektálhattunk. Az ATF6 útvonalnál magát az ATF6 proteolitikus hasítását vizsgáltuk, mely hasítást követően sejtmagi transzlokizációja a hajtogatásért felelős dajkafehérjék (Grp78, Grp94, kalretikulin) expresszióját indítja be. Ezen vizsgált szenzorfehérjékhez normál állapotban a Grp78 kapcsolódik és gátolja azok kifejeződését. Tekintve, hogy a Grp78 kötődési affinitása nagyobb a rendezetlen fehérjékhez, mint a szenzorfehérjékhez, így a Grp78 expressziót is megvizsgáltuk. Dózis- és időgörbe függvényében magas Grp78 kifejeződést detektáltunk. Összeségében elmondható, hogy az UPR által beindított fokozott ER stressz jelenléte detektálható és az ER hajtogatási kapacitásának javító mechanizmusai beindultak. Magát a HIER stresszt, mint jelenséget, ezekkel a kísérletekkel bizonyítani tudtuk mindkét sejt típuson. A HIER stressz detektálást követően a szervezetben is működő akutfázis fehérjékkel próbáltunk gátlást elérni. A hemopexin, mely stöchiometrikusan 1:1 arányban és az alfa-1-mikroglobulin mely 1:2 arányban képes hemet kötni exogén módon, képes lehet a HIER stresszt gátolni. Kísérleteink során a két akut fázis fehérje sikeren gátolta az IRE1, a PERK és az ATF6 útvonalak

aktivációját, illetve a Grp78 kifejeződését is. Ez arra enged következtetni, hogy az UPR kaszkád az indukáló ágens jelenléte nélkül nem indult be. A hem, mint szabadgyök generáló vegyület számos tanulmányban megjelenik. A sejtek oxidatív károsodása negatív hatással lehet az ER funkciójára, így a hajtogatási kapacitás kóros emelkedésével az ER stressz kaszkádok beindulhatnak. Maga ez az antioxidáns útvonalak és ER stressz kaszkádok több ponton is kapcsolatba lépnek, például Nrf2/HO-1 szignalizációval a PERK-en és az IRE1-en keresztül is. A NAC, mint gyökfogyó molekula kapcsolatát is vizsgáltuk a HIER stresszben. Eredményeinkből látható, hogy az akut fázis fehérjékhez hasonlóan gátolja az UPR útvonalak központi fehérjéinek expresszióját.

Irodalmi adatok szerint a klasszikus ER stressz bizonyos kémiai chaperonok-ok alkalmazása mellett csökkenthető vagy teljes mértékben gátolható. Az általunk választott fenil-butírsav (4-PBA) és a nátrium-valproát (VPA) csak részben vagy kis mértékben tudta gátoljon a HIER stressz kifejeződését. Ellentétben a hem-proteinekkal történt gátlásokkal, a kémiai chaperonok-ok a stresszkarok csak egyik pontját tudták gátolni, vagy kis mértékben a többi vizsgált célfehérje expresszióját. A PERK által aktivált apoptózis irányát mutató CHOP jelenléte továbbra is magas volt a kezelt sejteknél, ellenben a hem katabolizmusért felelős HO-1 és a normális hajtogatásért felelős Grp78 szintje erősen csökkent. Ez arra enged következtetni, hogy a klasszikus ER stressz és a HIER stressz különböző útvonalakon fejti ki hatását a sejtekben.

Vizsgálataink szerint a HO-1/H-ferritin rendszer központi szerepet tölt be a HIER stressz lefolyásában. Ennek bizonyítására siRNS alapú géncsendesítéssel inaktívvá tettük a rendszert és vizsgáltuk az ER stressz mintázatát. A HO-1/H-ferritin rendszer hiányában az ER stressz karok vizsgált fehérjei szignifikánsan nagyobb expressziót mutattak a vad típusú sejtekhez képest. Érdekes módon a HO-1 hiánya okozott csupán drasztikus választ, a H-ferritin hiányában nem történt változás. A HO-1 géncsendesítést követően láthattuk, hogy a HO-1 jelenléte kruciális a HIER stressz elleni védekezésben. A sejtek hem-argináttal történő kondicionálását követően a stressz kifejtése előtt már meglévő, magasabb HO-1 készlettel rendelkező sejtek nem mutatták az ER stressz jelenlétét. Se a korai, se a kései fázisokban nem detektáltunk UPR szenzorfehérje expressziót. Ennek tükrében a klinikumban használt hem-arginát akár az extra- és intravaszkuláris bevézésekkel járó beavatkozások előtti potenciális induktor is lehetne, mely felkészíti a sejteket a várható HIER stresszre. Eredményeinkből látható, hogy a HIER stressz HO-1 hiányában fokozódik és emelkedett HO-1 szint mellett kivédhető. A HO-1 indukálta hem katabolizmust követő folyamatok és intermedier termékek hatását vizsgáltuk tovább. A biliverdin-reduktáz hiányos állapot, a bilirubin kezelések se pozitív, se negatív hatást nem

fejtettek ki HIER stressz lefolyására. A degradáció során felszabadul CO irodalmi adatok szerint számos jelátviteli útvonalban részvevő gáztranszmitter molekula. Megfigyelték, hogy az exogén módon adott CO-al aktiválható az Nrf2 fehérje a PERK foszforilációján keresztül, amely HO-1 expressziót indít be. Mindemellett a CO a CHOP expressziójának csökkentésével is ellensúlyozza az apoptózis mértékét. Méréseink alapján egyedül az exogén módon adott CO donorok voltak képesek gátolni a HIER stresszt. Azonban számottevő HO-1 expressziót nem okoztak. Ennek tükrében a CO/HO-1 rendszer pozitív hatással lehet az ER stresszel társult érrendszeri megbetegségek kezelésében.

A HO-1 deficiencia akár veleszületett, akár funkcionális, drámaian megnöveli a sejtek érzékenységet a hem irányába és a kellően hosszútávú hem-toxicitás esetén sejthalált is okoz. Vélhetőleg rövid idejű hemstressznél, inert HO-1 jelenlétében az ER stressz mértéke enyhébb a stresszszint nem ér el egy küszöbértéket, így a sejt túlélését elősegítve csupán az UPR indukálódik. Hosszabb idejű hem-stressznél, HO-1 hiányos állapotban az ER stressz mértéke elég erős, hogy a stressz meghaladja a küszöbértéket, így az UPR mellett az apoptotikus jelátvitel is irreverzibilis lesz. Citotoxicitási kísérletünkben HO-1 hiányos állapot előidézése mellett (HO-1 géncsendesítés) többféle sejthalál gátlót alkalmaztunk a sejtekenél. Kimutattuk, hogy sem az apoptózis, se ma nekroptózis, sem pedig a ferroptózis gátlók nem voltak képesek a sejthalált kivédeni. Sejtes kísérletünk mellett humán *ex vivo* CEA endarkterektómiás mintákból RNS szekvenálást és immunhisztokémia festéseket végeztünk. Az RNS szekvenálás alátámasztotta a sejtmodelljeinknél kapott eredményeket. Az ER stressz (ATF5, ATF6, CANX, CHOP, Grp78, HSP90B1) gének a komplikált bevérzett lézióból származó mintáknál magas szinten expresszálódtak, mint az egészséges szövetből nyert mintáknál. Ezek alapján a plakk progresszió során a bevérzést követően, amikor a szabad hem feldúsul a plakk belsejében magasfokú ER stressz fejeződik ki. Ugyanazon mintákból, melyekből RNS szekvenálást végeztünk szövetmetszeteket is készítettünk. Az egészséges, ateróma, komplikált lézió (friss és idült bevérzéssel) reprezentálták a plakk progresszió stádiumait. A CHOP, Grp78 festések megerősítették, hogy friss és idült bevérzéssel mintáknál fokozott expresszió figyelhető meg az egészséges és bevérzés nélküli ateróma mintákhoz képest. A SMA festés reprezentálja a simaizomok jelenlétét kolokalizálva a CHOP és Grp78 festésekkel, illetve az friss és idült bevérzés helyén történő neovaszkularizáció okozta kis erek endothelsejtjei is pozitív festődést mutatnak. Vizsgálataink alapján összeségében elmondható, hogy az ER stressz hemolitikus körülményeknél és vérzéssel járó *atherosclerotikus* körülmények között *in vitro* és *ex vivo* is magas szinten jelen van.

VII. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Gáll Tamásnak** a magas színvonalú szakmai irányításáért, útmutatásaiért és töretlen segítségnyújtásért. Türelméért és tanítási hajlandóságáért végtelen hálás vagyok. Az elmúlt években akár a kutatási témával kapcsolatban, akár egyéb szakmai dologgal bátrán fordulhattam hozzá tanácsért és támogatásért.

Köszönöm **Dr. Balla György és Dr. Balla József** professzor uraknak, hogy kutatócsoportjuk és az általuk vezetett intézetek égisze alatt, szakdolgozó koromtól kezdve mostanáig a rám szabott feladatokhoz és munkákhoz magas színvonalú szakmai- és anyagi háttért biztosítottak számomra.

Szintén hálásan köszönöm a Vaszkuláris Biológia Kutató Laboratórium volt és jelenlegi munkatársainak segítségéért, külön kiemelve **Dr. Nagy Annamáriát**. A mindennapokban nélkülözhetetlen segítségéért, támogatásáért és az évek alatt kialakult barátságáért hálás vagyok.

Külön köszönet publikációk magyar és külföldi társszerzőinek, hogy rendkívül értékes munkájuk és szakmai támogatásuk segített munkám során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a családomnak és barátaimnak, szeretetüket és biztatásukat.

A kutatómunkát támogató pályázatok:

OTKA-K112333, GINOP-2.3.2-15-2016-00043, HUN-REN (11003), OTKA-K132828, EFOP-3.6.2-16-2017-00006, ED_18-1-2019-0028, TKP2020-NKA-04, EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, KKM/33659-2/2024/Adm.

Közlemények listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/495/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Pethő Dávid
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Pethő, D.**, Hendrik, Z., Nagy, A., Beke, L., Patsalos, A., Nagy, L., Póliska, S., Méhes, G., Tóth, C., Potor, L., Eaton, J. W., Jacob, H. S., Balla, G., Balla, J., Gáll, T.: Heme cytotoxicity is the consequence of endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaque progression. *Sci. Rep.* 11 (1), 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-89713-3>
IF: 4.996
2. Gáll, T., **Pethő, D.**, Nagy, A., Hendrik, Z., Méhes, G., Potor, L., Gram, M., Akerström, B., Smith, A., Nagy, P. F., Balla, G., Balla, J.: Heme Induces Endoplasmic Reticulum Stress (HIER Stress) in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Front. Physiol.* 9, 1-25, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2018.01595>
IF: 3.201

További közlemények

3. Gáll, T., **Pethő, D.**, Erdélyi, K., Egri, V., Balla, G. J., Nagy, A., Nagy, A., Póliska, S., Gram, M., Gábrriel, R., Nagy, P., Balla, J., Balla, G.: Heme: a link between hemorrhage and retinopathy of prematurity progression. *Redox Biol.* 76, 1-24, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2024.103316>
IF: 10.7 (2023)
4. Somodi, L., Horváth, E., Bárdos, H., Baráth, B., **Pethő, D.**, Katona, É., Balla, J., Mutch, N. J., Muszbek, L.: Cellular FXIII in Human Macrophage-Derived Foam Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 24 (5), 1-12, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24054802>
IF: 4.9





5. Nagy, A., **Pethő, D.**, Gesztelyi, R., Juhász, B., Balla, G., Szilvássy, Z., Balla, J., Gáll, T.: BGP-15 Inhibits Hyperglycemia-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate.
Int. J. Mol. Sci. 22 (17), 1-23, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179263>
IF: 6.208
6. **Pethő, D.**, Gáll, T., Hendrik, Z., Nagy, A., Beke, L., Gergely, P., Méhes, G., Tóth, C., Gram, M., Akerström, B., Balla, G., Balla, J.: Ferryl Hemoglobin and Heme Induce A1-Microglobulin in Hemorrhaged Atherosclerotic Lesions with Inhibitory Function against Hemoglobin and Lipid Oxidation.
Int. J. Mol. Sci. 22 (13), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22136668>
IF: 6.208
7. Potor, L., Hendrik, Z., Patsalos, A., Katona, É., Méhes, G., Pólska, S., Csósz, É., Kalló, G., Komáromi, I., Combi, Z., Posta, N., Sikura, K. É., **Pethő, D.**, Oros, M., Vereb, G., Tóth, C., Gergely, P., Nagy, L., Balla, G., Balla, J.: Oxidation of hemoglobin drives a proatherogenic polarization of macrophages in human atherosclerosis.
Antioxid. Redox Signal. 35 (12), 917-950, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2020.8234>
IF: 7.468
8. Posta, N., Csósz, É., Oros, M., **Pethő, D.**, Potor, L., Kalló, G., Hendrik, Z., Sikura, K. É., Méhes, G., Tóth, C., Posta, J., Balla, G., Balla, J.: Hemoglobin oxidation generates globin-derived peptides in atherosclerotic lesions and intraventricular hemorrhage of the brain, provoking endothelial dysfunction.
Lab. Invest. 100 (7), 986-1002, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41374-020-0403-x>
IF: 5.662
9. Potor, L., Sikura, K. É., Hegedűs, H., **Pethő, D.**, Szabó, Z., Máthéné Szigeti, Z., Pócsi, I., Trencsényi, G., Szikra, D. P., Garai, I., Gáll, T., Combi, Z., Kappelmayer, J., Balla, G., Balla, J.: The Fungal Iron Chelator Desferricoprofen Inhibits Atherosclerotic Plaque Formation.
Int. J. Mol. Sci. 21 (13), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21134746>
IF: 5.924
10. Gáll, T., **Pethő, D.**, Nagy, A., Balla, G., Balla, J.: Therapeutic Potential of Carbon Monoxide (CO) and Hydrogen Sulfide (H₂S) in Hemolytic and Hemorrhagic Vascular Disorders-Interaction between the Heme Oxygenase and H₂S-Producing Systems.
Int. J. Mol. Sci. 22 (1), 1-24, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22010047>
IF: 5.924





11. Nagy, A., **Pethő, D.**, Gáll, T., Zavaczki, E., Nyitrai, M., Posta, J., Zarjou, A., Agarwal, A., Balla, G., Balla, J.: Zinc Inhibits HIF-Prolyl Hydroxylase Inhibitor-Aggravated VSMC Calcification Induced by High Phosphate.
Front. Physiol. 10, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01584>
IF: 4.566
12. Potor, L., Nagy, P., Méhes, G., Hendrik, Z., Jeney, V., **Pethő, D.**, Vasas, A., Pálkás, Z., Balogh, E., Gyetvai, Á., Whiteman, M., Torregrossa, R., Wood, M. E., Olvasztó, S., Nagy, P. F., Balla, G., Balla, J.: Hydrogen Sulfide Abrogates Hemoglobin-Lipid Interaction In Atherosclerotic Lesion.
Oxidative Med. Cell. Longev. 2018, 1-16, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3812568>
IF: 4.868

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 70,625

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,197**

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

Debrecen, 2024.09.30.

